

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年5月17日 (17.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/34785 A1

(51) 国際特許分類7: C12N 9/48, 15/57, 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬
株式会社内 Ibaraki (JP). 小原 収 (OHARA, Osamu)
[JP/JP]; 〒292-0801 千葉県木更津市請西二丁目20
番25号 Chiba (JP). 長瀬隆弘 (NAGASE, Takahiro)
[JP/JP]; 〒292-0042 千葉県木更津市清見台南二丁
目6番5号 Chiba (JP). 野村信夫 (NOMURA, Nobuo)
[JP/JP]; 〒292-0814 千葉県木更津市八幡台五丁目2
番11号 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07917

(22) 国際出願日: 2000年11月10日 (10.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/321740
1999年11月11日 (11.11.1999) JP

特願平2000-144020
2000年5月16日 (16.05.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP). 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番3 Chiba (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 山地 昇
(YAMAJI, Noboru) [JP/JP]. 西村耕一 (NISHIMURA, Kouichi) [JP/JP]. 阿部邦威 (ABE, Kunitake) [JP/JP];

(74) 代理人: 長井省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

/結葉有/

(54) Title: NOVEL METALLOPROTEASE HAVING AGGREGANASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

(57) Abstract: A novel metalloprotease having an aggrecanase activity which causes joint diseases; a gene encoding this metalloprotease; a promoter of the above metalloprotease; a method of screening a drug with the use of the above metalloprotease; and compositions for inhibiting the degradation of proteoglycans which contain as the active ingredient a substance inhibiting the aggrecanase activity of the above metalloprotease.

(57) 要約:

WO 01/34785 A1
本発明は関節疾患の原因となる、アグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ、該金属プロテアーゼをコードする遺伝子、該金属プロテアーゼのプロモーター、該金属プロテアーゼを用いた医薬のスクリーニング法、該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用組成物を提供する。



一 補正書・説明書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

技術分野

本発明は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ（以下、「関節疾患アグリカナーゼ」とする）、該「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、該「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、該「関節疾患アグリカナーゼ」を用いた、アグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、該アグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、及び該「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子に関するものである。

背景技術

関節疾患は、関節軟骨の損傷・変性を主病変とする疾患である。関節疾患の中で最も患者数の多い疾患は変形性関節症（OA）であるが、現行の治療法においては鎮痛消炎剤やヒアルロン酸製剤が軟骨変性・軟骨下骨破壊に伴う痛みを軽減する目的で対症療法的に用いられているに過ぎず、十分な治療効果を上げているとは言えない状況にある。

関節軟骨は主にII型コラーゲンと軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンから構成される組織であり、関節疾患では両者の分解・変性が観察されている。そのため、古くよりこれら細胞外マトリクス成分の分解・変性の制御が関節疾患の治療に繋がると考えられており、分解に関与するプロテアーゼ（コラゲナーゼ、アグリカナーゼ）の同定、そして、それらに対する阻害剤の探索、医薬品としての開発の試みが精力的に行われてきた。

コラゲナーゼ活性を有するプロテアーゼとしてはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP1、MMP8、MMP13、MMP14 等) が同定され、それぞれの選択的阻害剤が発見されていた。しかしながら、多数のコラゲナーゼ阻害活性を有する MMP 阻害剤を OA、リューマチ性関節炎 (RA) を含む関節疾患治療薬として開発する動きがあったにもかかわらず、これらの疾患を適応症とする MMP 阻害剤は上市されていなかった。このような状況下、関節軟骨のもう一つの主要構成成分であるアグリカンを選択的に分解するアグリカナーゼが注目された。

アグリカンの Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間を切断する酵素アグリカナーゼが関節疾患に関与することは、Sandy らや Lohmander らのヒト関節疾患患者の滑液中に検出される主要なアグリカン分解断片がいずれもアグリカナーゼ切断部位での切断により生じているとした論文で明らかにされていた (Sandy J. D. et al., J Clin. Invest. 89, 1512-1516, 1992; : Lohmander L. S. et al., Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993)。一方、関節軟骨の体外移植培養系において、IL-1 誘導により、まずアグリカンの分解が起こり、続いて II 型コラーゲンの分解が亢進することが知られていた (Dingle L. T. et al., Ann. Rheum. Dis. 34, 303-311, 1975; Cawston T. E. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 215, 377-385, 1995; Kozaci L. D. et al., Arthritis Rheum. 40, 164-174, 1997)。マウス関節炎モデルにおいてもアグリカン分解が II 型コラーゲン分解に先行することが報告されていた (van Meurs J. B. et al., Arthritis Rheum., 42, 1128-1139, 1999)。これらのこととは、先行するアグリカン分解を阻害することにより II 型コラーゲン分解をも制御しうる可能性を示唆していた。

ところが、金属プロテアーゼであること、細胞外に存在すること、基質認識に糖鎖の関与があること、IL-1、TNF、レチノイン酸で活性が誘導されること等の生化学的性質が分かっていたにも係わらず、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ（「関節疾患アグリカナーゼ」）の本体は長い間不明のままであった。最近になり、ADAMTS4 (aggrecanase-1: Tortorella M. D. et al., Science., 284,

1664-1666, 1999)、ADAMTS11 (aggrecanase-2: Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) がアグリカナーゼ活性を有するプロテアーゼとして報告された。しかし、これらはヒトOA軟骨で遺伝子発現増強されておらず、また、ヒト膝関節軟骨の体外移植培養系において、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を誘導する IL-1、TNF、レチノイン酸で遺伝子発現誘導されないことから、「関節疾患アグリカナーゼ」ではないことが判明した。

(Flannery C. R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999)。上述の通り、「関節疾患アグリカナーゼ」は、未だ取得されていない。

本発明の開示

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、「関節疾患アグリカナーゼ」である、アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼをコードする遺伝子を単離し、全長 ORF 配列を決定して、組み換え蛋白の生産を可能にすることに成功した。

さらにまた、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同新規蛋白の製造法を確立した。

また、本発明者らは、該蛋白を用いたスクリーニング法を提供し、当該スクリーニング法を実施し、選択された化合物が「アグリカナーゼ活性」（即ち、該蛋白が有する細胞外基質アグリカンを Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間で選択的に切断する活性）を有意に阻害し、関節疾患の予防及びまたは治療に有用な医薬品となり得ることを見出した。

さらに関節疾患の予防及びまたは治療用医薬品のスクリーニングに有用な、該蛋白のプロモーター遺伝子を単離し、本発明を完成させた。

即ち本発明は、

[1] 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸

配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

[2] 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

[3] 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

[4] [1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子、

[5] [4]に記載の遺伝子を含むベクター、

[6] [5]に記載のベクターを含む宿主細胞、

[7] [6]に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、[1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法、

[8] [1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体、

[9] [1]乃至[3]の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、

-5-

[10] [1] 乃至 [3] に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、

[11] 配列番号 24、25、26、27、28、29、30 若しくは 31 で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物、

に関する。

あるいは本発明は、プロテオグリカン分解抑制用医薬の製造における、[1] 乃至 [3] の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアグリカナーゼ活性を阻害する物質の使用に関する。

さらに本発明は、[9] に記載のスクリーニング方法によって得ることができる、当該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質の、関節疾患治療における使用に関する。

また、本発明は [11] に記載の遺伝子を用い、当該遺伝子のプロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法に関する。

発明の実施の形態

以下、本発明で使用される用語につき説明する。本明細書中で使用される「アグリカナーゼ」は、亜鉛配位コンセンサス配列 (HE_{xx}H) を有し、かつ、関節軟骨に存在するアグリカンを Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間で選択的に切断する活性、即ち「アグリカナーゼ活性」を有する金属プロテアーゼを意味する。また、「アグリカナーゼ」は断りがない限り、「蛋白」を表す。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物ならいざれでもよい。

また、好ましくは本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

さらに好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物」とは、(1)配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)の部位において、1乃至複数個(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(2)配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)の部位において、1乃至複数個(好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個)のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(3)配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸

配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の起源はヒトに限定されない。例えば、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼが含まれる。また、配列番号 1 に記載した「関節疾患アグリカナーゼ」の配列を基にして、遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白などが含まれる。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、上記の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、即ち、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいざれでもよい。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいざれでもよい。

さらに、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配

列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するを含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいざれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子」とは、（1）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（2）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（3）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において

て、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、である。.

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子として好ましくは、配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番、1番から2061番、1番から2850番、637番から1749番、637番から2061番、若しくは637番から2850番を有する遺伝子であり、特に好ましくは配列番号2記載の塩基配列の637番から1749番、637番から2061番、637番から2850番を有する遺伝子である。

本発明のプロモーター遺伝子は、好ましくは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列を有する遺伝子である。「配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、「関節疾患アグリカナーゼ」プロモーター活性を有する遺伝子である。「プロモーター活性」とはDNA鎖の情報をRNA鎖に転写するための開始部位として働く活性を意味する。

GENBANK及びSwissProtのBLAST (Basic local alignment search tool) (S. F. Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410)検索結果によれば、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の1つであるMDTS6のアミノ酸配列（配列番号1）（950アミノ酸）、及び、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号2）（2853塩基対）は新規である。前述のADAMTS4、ADAMTS11とアミノ酸配列でのホモロジー検索を行ったところ、配列同一性は50%以下であった。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼと相同性の高い、アグリカナーゼ活性を

有する金属プロテアーゼが含まれる。相同性の高い、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼとは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。相同性は前述のBLAST検索アルゴリズムを用いて特定することができる。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる。該アグリカナーゼ活性を阻害する物質は、プロテオグリカン分解抑制用組成物として有用である。

加えて、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子はプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる点が注目される。本明細書において「プロモーター活性を阻害する物質」とは、プロモーターとしての働きを抑え、「関節疾患アグリカナーゼ」の発現を抑制する物質を意味する。本発明には該アグリカナーゼのプロモーター遺伝子を用いたプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、及び当該プロモーター活性を阻害する物質の関節疾患予防及びまたは治療のための使用が含まれる。さらには、「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子には複数の変異体、すなわち遺伝子多型が存在する。したがって、該遺伝子多型と関節疾患を含む該アグリカナーゼの関与が想定される疾患との相関解析に用いられ、結果として、遺伝子診断のマーカーとして用いられる可能性がある。

ここで、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を検出する方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」に反応する抗体の製造方法、本発方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」に反応する抗体の製造方法、本発

明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、プロモーター活性を検出する方法、プロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法を以下の 1) ~ 7) に記載する。本発明には 1) ~ 7) に記載する事項全てを包含する。以下、1) ~ 7) では「関節疾患アグリカナーゼ」を「蛋白」として説明する。

1) 蛋白遺伝子の製造方法

a) 第 1 製造法 - PCR を用いた方法

本発明の新規蛋白を产生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該新規蛋白 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ 2 種類のプライマーを作製する。denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白のそれぞれに適した逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応（以下 RT-PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。もしくは、本発明の新規蛋白を产生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から調製した mRNA から逆転写酵素により作製した cDNA あるいは市販の該ヒト細胞あるいは組織由来の cDNA を鋳型とした、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該新規蛋白を製造することができる。

まず、本発明の新規蛋白の產生能力を有する細胞あるいは組織から該プロテアーゼをコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート - グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該プロテアーゼの產生能力を有する細胞あるいは組織は、該プロテアーゼをコードする塩基配列を有する

遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンプロッティング法、該プロテアーゼに特異的な抗体を用いたウエスタンプロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ (dT) セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出精製済みの mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー、オリゴ dT プライマーまたはカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規蛋白 DNA を増幅する。また、cDNA を合成せずとも、市販の cDNA を用いてもよい。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

b) 第 2 製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法の他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した後、この 1 本鎖 cDNA から 2 本鎖 cDNA を合成する。その方法としては S 1 ヌクレアーゼ法 (Efstratiadis, A. et al., Cell, 7, 279-288, 1976)、Land 法 (Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo 法 (Yoo, O. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、Okayama-Berg 法 (Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982) などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えば DH5 α 株、HB101 株、JM109 株等に導入して形質転換させて、テトラサイクリン、アンピシ

リン、カナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として組換体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には Hanahan の方法 (Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち CaCl_2 や MgCl_2 または RbCl を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。もちろん、市販のコンピテント細胞を使用しても構わない。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規蛋白の DNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

①合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し（この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる）、これをプローブ（ ^{32}P 又は ^{33}P で標識する）として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。

②ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応 (Saiki, R. K. et al., Science 239, 487-491, 1988) を行い、目的の新規蛋白の全部又は一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる錆型 DNA としては、該新規蛋白を產生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、またはゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA を断片を ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼ

ーションまたはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③他の動物細胞で新規蛋白を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞外に産生させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて該新規蛋白を検出することにより、元の形質転換株より目的の新規蛋白をコードする cDNA を有する株を選択する。

④本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組込み、形質転換株の培養上清、細胞内もしくは細胞表面に蛋白を産生させ、本発明の新規蛋白に対する抗体および該抗体に対する 2 次抗体を用いて、所望の新規蛋白産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルター等にプロットし、本発明の新規蛋白産生細胞からの mRNA をハイブリダイズさせた後、cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収された mRNA を蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の新規蛋白をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マ

ニュアルに従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

c) 第3製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機〔例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など〕を用いて合成することができる。

d) 第4製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、新規蛋白の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al., *Nature*, 10, 105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al., *Nucleic Acids Res.*, 9, r43-r74, 1981)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis) (Mark, D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5662-5666, 1984)等に従うことができる。

以上、a) 乃至d) により得られるDNAの配列決定は、例えばマキサム-ギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980)やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269-276, 1982)等により行うことができる。

2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組み換え蛋白の製造方法

単離された本発明の新規蛋白をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、真核生物および原核生物の宿主細胞を形質

転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. Cell, 23, 175-182, 1981) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社製) 等がよく用いられるが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S., et al. Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4 (Invitrogen 社製) 等を例示できるが、これらに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and

-17-

Magnusson, G.,, Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J.,, Virology, 52, 456-457, 1973)、FuGENETM6 Transfection Reagent(Boehringer Mannheim社製)を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al.,, EMBO J., 1, 841-845, 1982)等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) や pSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P., J., Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより新規蛋白を安定に产生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社製)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞外に本発明の新規蛋白が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞の細胞外に生産される本発明の新規蛋白は、該新規蛋白の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法によ

り、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該新規蛋白を含む培養液を通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の新規蛋白はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該新規蛋白の発現の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。また、マーカー配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

3) 本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性を検出する方法

本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性は、本発明の関節疾患アグリカナーゼと以下に挙げる基質とを適当な緩衝液中で混合し、反応させた後、それぞれの基質にあった方法で検出することができる。

基質としては、ヒトもしくは他の動物の軟骨・組織より精製したアグリカン、あるいは遺伝子組換えアグリカン、市販のアグリカン（生化学工業製）、もしくはそれらの部分蛋白を用いることができる。これらの基質と被試験プロテアーゼを含む細胞・組織培養液、細胞・組織抽出液もしくは（部分）精製標品を反応させ、Glu³⁷³-Ala³⁷⁴の間で切断された断片を検出することによりアグリカナーゼ活性を測定することができる。Glu³⁷³-Ala³⁷⁴の間で切断された断片の検出には、常法に従い分解断片のN末端配列もしくはC末端配列を決定する手法や、より簡便にGlu³⁷³-Ala³⁷⁴の間で切断されることにより生じるC末端のNITGE³⁷³、N末端の374ARGSVを特異的に認識する抗ネオエピトープ抗体

(Hughes C. E. et al., Biochem J., 305, 799-804, 1995) を用いた ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) やウエスタンプロティング等の免疫学的手法を用いることができる。好ましくは、実施例 7 および 9 記載の方法で実施することができる。

4) 本発明の新規蛋白に反応する抗体の作製方法

本発明の新規蛋白に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該新規蛋白や該新規蛋白の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明新規蛋白をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下または静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスティンの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

-20-

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチングアシンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスマエローマ細胞株 P3X63Ag8. U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリーコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル最小必須培地、ダルベッコ修飾最小必須培地、RPMI-1640などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの單クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で数日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、 Fab 、 Fab' 、 Fv を得ることができる。

さらには、本発明新規蛋白に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデラの方法 (Clackson, T. et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

5) 本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法

3) に示したアグリカナーゼ活性の検出法と同様の方法でスクリーニングが可能である。また、本発明の新規蛋白と反応させることにより分解され消滅・減少する添加したアグリカン、組換えアグリカン、市販のアグリカン、もしくはそれらの部分蛋白量を、アグリカナーゼで切断される部位の N 側および C 側部分のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて計測する実施例 10-2 に例示するような ELISA などの方法を用いることができる。さらには、本発明の新規蛋白と実施例 7-1 に例示するような N 末に FLAG タグ、C 末に His タグが付加した組換えアグリカンを反応させて分解され消滅・減少する添加した組換えアグリカン量を抗 FLAG タグ、抗 HIS タグ抗体を用いた ELISA 等で計測する方法が用いられる。この場合のタグは FLAG タグおよび His タグに限定されず、また、組換えアグリカンは実施例 7-1 に限定されず、本蛋白によりアグリカナーゼ切断部位で切断されるアグリカンの部分蛋白もしくは改変蛋白であればよい。アグリカナーゼ活性に用いる被験物質は、被験物質としては従来金属プロテアーゼ阻害活性を有することは知られているが該新規蛋白のアグリカナーゼ活性に対して阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., *Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995) や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., *J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用いうる。

本発明の新規蛋白のアグリカナーゼ活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、本発明の新規蛋白またはその部分ペプチドの基質となるものであればいずれのものでも使用可能であり、好ましくは前記3）に記載の基質である。

6) プロテオグリカンの分解・遊離検出方法

軟骨プロテオグリカンの分解・遊離の検出、計測には、実施例11-2に例示される³⁵SO₄²⁻をトレーサーとして用いる方法、プロテオグリカン抗体を用いる方法、ゲルろ過により分解断片を検出する方法 (Methods in Cartilage Research, Academic Press Limited., 1990; Joint Cartilage Degradation, Marcel Dekker, Inc., 1993) や、1,9-dimethylmethylen blue (DMMB) を用いた比色法 (Goldberg R. L. and Kolibas L. M., Connect. Tissue Res., 24, 265-275, 1990) などが用いられるが、これらに限定されない。

7) 本発明のプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングの方法

本発明のプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする際、そのプロモーター活性を検出する方法としては、実施例13に示した配列（配列番号24乃至31）およびその部分配列が有するレポーター遺伝子プラスミドを用いる方法が簡便である。レポーター遺伝子とは通常の手段（例えば、酵素活性の測定等、当業者に既知の定量法）によって定量することができる蛋白をコードする遺伝子を指し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ遺伝子がよく用いられているがこれらに限定されない。レポーター遺伝子プラスミドを構築する基となるベクターに関しては制限はなく、市販のプラスミドベクター、例えば、pGV-B2（東洋インキ社製）やpSEAP2-Basic（Clontech社製）などを用いることができる。これらのベクターのレポーター遺伝子の上流に当該配列を順方向に挿入したレポーター遺伝子プラスミドを構築し、このプラスミドで形質転換した細胞において発現されるレポーター蛋白の量をそれぞれに適した方法で測定

することにより当該配列のプロモーター活性の有無、強度を知ることができ、また、上記形質転換細胞の培養液に被験物質を添加することにより、被験物質の当該プロモーター活性に及ぼす作用を検出することができる。

本発明の配列番号の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、上記のプロモーター活性を検出する方法と同様の方法を用いることができる。被験物質としては従来プロモーター活性を阻害することは知られているが配列番号 24 乃至 31 の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., *Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995) や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., *J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991)などを応用して作製されたランダム・ペプチド群、抗体及び抗体断片を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用い得る。

本発明には、前記スクリーニング法により選択される「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）を有効成分とする医薬が含まれ、特に医薬として好ましくはプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物である。「関節疾患アグリカナーゼ」の活性を有意に阻害する物質としては、実施例 10-2 で示されるスクリーニング系で選択された、 $N^{\alpha}-[2-(1-\text{ヒドロキシカルバモイル}-2-\text{スルファンエチル})-4-\text{メチルペンタノイル}]-N, \text{O-ジメチルチロシンアミド}$ （以下、化合物 A とする）、 $N^{\alpha}-[2-(1-\text{ヒドロキシカルバモイル}-2-$

ースルファニルエチル) - 4 - メチルペントノイル] - N - メチルフェニルアラニンアミド (以下、化合物Bとする) 、 N ^α - [2 - (1 - ヒドロキシカルバモイル - 2 - フェニルスルファニルエチル) - 4 - メチルペントノイル] - N, O - ジメチルチロシンアミド (以下、化合物Cとする) 、 N ^α - [2 - (1 - ヒドロキシカルバモイル - 2 - メチルスルファニルエチル) - 4 - メチルペントノイル] - N, O - ジメチルチロシンアミド (以下、化合物Dとする) などが挙げられる。上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物Dは、W090/05719の請求の範囲に含まれる化合物であるが、本発明はそれらの化合物を有効成分とする医薬に限らず、「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質を有効成分とする医薬であれば全て包含される。尚、上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物DはW090/05719に収載された製造方法に準じてW090/05719に収載された化合物と同様に合成することができる。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質 (化合物、ペプチド、抗体または抗体断片) を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注、関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、

溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿润剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80 等を含む。該組成物はさらに湿润剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60 kg として）において、1 日につき約 0.1～1000 mg、好ましくは 0.1～100 mg である。非経口投与の場合、注射剤の形では 1 日につき約 0.01～1000 mg、好ましくは 0.01～100 mg である。

図面の簡単な説明

図 1 は実施例 6 で得られた、ECL ウエスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 の動物細胞株での発現結果を示す写真である。

図 2 は実施例 7-2 で得られた、ECL ウエスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出結果を示す写真である。

図 3 は実施例 7-3 で得られた、ウエスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 で分解された組換えアグリカン G1G2 の抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析結果を示す写真である。

図 4 は実施例 8 で得られた、IL-1 β による MDTS6 mRNA の発現誘導を検討した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図 5 は実施例 9-2 で得られた、MDTS6 蛋白による天然型アグリカンの分解をウエスタンブロッティング検出システムを用い、抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した結果を示す写真である。

図 6 は実施例 11-2 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞からの all-trans レチノイン酸および IL-1 β によるプロテオグリカンの遊離を検出した結果を示すグラフである。

図 7 は実施例 11-3 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞を all-trans レチノイン酸および IL-1 β 処理した場合の MDTS6 の遺伝子発現変動を RT-PCR 法により解析した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図 8 は実施例 12 で得られた、all-trans レチノイン酸によるウサギ膝関節初代培養細胞からのプロテオグリカンの分解・遊離が化合物 A および化合物 B により抑制されることを示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に説明する。

特に断りのない限り、公知の方法 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等

の遺伝子操作実験マニュアルに従ったが、本発明は実施例に限定されるものではない。

(実施例 1) 新規 ADAMTS 遺伝子 MDTS6 の部分配列の発見

ヒト脳由来 cDNA ライブラリーは文献 (Ohara O. et al., DNA Res., 4, 53-59, 1997) に示すように挿入配列の大きさによって厳密に分画されたものを構築した。これらのサブライブラリーの cDNA 断片のサイズ分布は 3kbp-8kbp である。このライブラリーを構成するクローンの 5'-及び 3'-末端の配列を解読し、自家製の EST データバンクを構築した。この中から、MDTS6 の部分配列を得た。

(実施例 2) MDTS6 の全長 ORF 配列の決定

MDTS6 の cDNA クローンの配列を決定することにより、配列番号 2 の 832 番から 2853 番の配列を得た。配列番号 2 の 1 番から 831 番の配列は、Clontech 社製のヒト脳およびヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、LA-Taq™ (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を繰り返すことにより取得した。その結果、全長 MDTS6 は、配列番号 1 に示すように 950 アミノ酸からなる新規蛋白であることが判明した。そのドメイン構造は N 末から、分泌シグナル配列、プロ領域、furin プロテアーゼ認識配列、金属プロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、トロンボスポンジン I 型繰り返し配列（以下、TSP-I 繰り返し配列という）、Cys 残基に富むドメイン、中間領域、TSP-I 繰り返し配列 2 個であり、ADAMTS ファミリーに属する分子であった (Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Tang, B. L. et al., FEBS Lett., 445, 223-225, 1999)。

(実施例 3) C 末 FLAG 付加型発現ベクターの作製

pCEP4 (Invitrogen 社製) を制限酵素 *Clal*、*NsII* で切断し、平滑末端化後、自己連結反応を行い、EBNA1 発現ユニットを除去した発現ベクター pCEP4d を作製した。このベクターを制限酵素 *NheI*、*BamHI* で切断し、アガロースゲル抽出した約 7.7kbp の断片に、配列番号 3 で示される核酸と配列番号 4 で示される核

酸をアニールさせた重鎖オリゴヌクレオチドを挿入して、目的の配列を有するクローニングを選択し、pCEP4d-FLAGと命名した。このベクターを鋳型、配列番号5で示されるオリゴDNA、配列番号6で示されるオリゴDNAをプライマーとして、PyroBest™ DNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行った。生じた約0.4kbpのDNA断片を制限酵素SpeIで切断し、XbaIで切断したpCEP4d-FLAG(約7.7kbp)に挿入し、目的通りプロモーターよりクローニングサイトのXbaI、NheI、NotI、BamHI認識配列そしてFLAGタグという順になっているクローニングを選択して、pCEP4dE2-FLAGを完成した。

(実施例4) MDTS6 短長蛋白(MDTS6TSP1) 発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から583番(MDTS6のN末端からTSP1繰り返し配列を含む領域(以下MDTS6TSP1とする)に相当する部分)をC末端にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1番から1749番の遺伝子をPCRにより取得した。配列番号7と配列番号8で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-Ready™ cDNA(Clontech社製)を鋳型、LA-Taq™(宝酒造社製)をDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを10回行った。この反応液を50倍希釈したDNA溶液を鋳型として、PyroBest™ DNAポリメラーゼを用い、94℃2分の後、98℃10秒、66℃30秒、74℃4分のサイクルを40回、続いて72℃10分の条件でPCRを行った。こうして生成した5'側にXbaI認識配列およびKozak配列を、3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローニングして配列を確認した後、制限酵素XbaI、NotIで切断し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS6TSP1-FLAGを完成した。

(実施例5) MDTS6 全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から950番をC末端にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号 2 の 1534 番から 2850 番の遺伝子を PCR により取得した。詳しくは、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマー、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、50℃15 秒、72℃2 分のサイクルを 20 回、続いて 72℃7 分の反応を行った。なお、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型とする代わりに、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社製) を鋳型、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃2 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 40 回、続いて 72℃7 分の反応条件で PCR を行うことにより、目的断片を生成することができた。こうして生成した 3' 側に NotI 認識配列が付加された目的断片を PCR-Blunt にサブクローンして配列を確認し、pCRB-MDTS6-3H とした。

配列番号 2 の 1566 番から 1571 番に BamHI 認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS6TSP1-FLAG を制限酵素 XbaI、BamHI で切断して生じた約 1.6 kbp の DNA 断片と、pCRB-MDTS6-3H を BamHI、NotI で切断して生じた約 1.3 kbp の DNA 断片を連結し、pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して、pCEP-MDTS6F-FLAG を完成した。

(実施例 6) MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現

実施例 4 において pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社製) に導入した。プラスミド導入後、1-2 日間培養して得た培養上清中に目的蛋白が存在することを、C 末端に付加した FLAG タグに対する抗体 (マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2; Sigma 社製) を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清を SDS/10%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社製) を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロックエース (大日本製薬社製) を添加してブロッキングした後、マウス抗

-30-

FLAG モノクローナル抗体 (M2; Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Zymed 社製もしくは TAGO 社製) を順次反応させた。または、ブロッキング後、ビオチン化 M2 抗体 (Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Amasham 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて該蛋白の発現を確認した (図 1)。発現された蛋白の分子量はアミノ酸配列から算出される値よりも約 23K 小さかった。上述の如く HEK293-EBNA 細胞にて発現させた MDTS6TSP1 の N 末端配列は、C 末端に FLAG タグが付加していることを利用して、実施例 7-1 の方法でアフィニティ精製した後、PVDF 膜に転写し、Ponceau S 染色された MDTS6TSP1 の N 末端配列を ABI 社 494 型ペプチドシークエンサーで解析することにより決定した。その結果、配列番号 1 の 213 番目の Phe から始まっており、他の ADAMTS 分子同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 583 番) になることが示された。また、MDTS6 全長蛋白についても実施例 5 で得られた発現プラスミドを用い、上記 MDTS6TSP1 の蛋白発現と同様に取得し、MDTS6TSP1 と同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 950 番) になることを確認した。

(実施例 7) 動物細胞を宿主に発現した MDTS6TSP1 蛋白の酵素活性の検出

(実施例 7-1) 組換えアグリカン GIG2 の調製

報告されているヒトアグリカンの遺伝子配列 (Doege K, et al. Biochem Soc Trans., 18, 200-202, 1990) をもとに合成した配列番号 11 と配列番号 12 で示されるオリゴ DNA をプライマー、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94°C 1 分の後、98°C 10 秒、68°C 2 分のサイクルを 40 回、続いて 68°C 7 分の反応を行った。生成した DNA 断片を制限酵素 BamHI で切断し、pCEP-SigFla の BamHI 部位に導入し、ヒト

アグリカンの球状ドメイン1 (G1) -球状ドメイン2 (G2) の N 末に FLAG タグ、 C 末に His タグの付加した蛋白を発現するために用いる発現プラスミド pCEP-rAgg を作製した。pCEP-SigFla は pCEP4d の HindIII、XbaI 部位に配列番号 13 と配列番号 14 で示されるオリゴ DNA の二重鎖を導入したものであり、プロモーターの下流に、文献 (Guan X-M. et al., J. Biol. Chem. 267, 21995-21998, 1992) に示されたインフルエンザウィルスの hemagglutinin 由来の分泌シグナル配列と FLAG タグ配列、続いて、BamHI 認識配列を有する発現ベクターである。

pCEP-rAgg を HEK293-EBNA 細胞に導入し、3-7 日培養して目的蛋白を発現、生産した。培養液上清からの目的蛋白の精製は、N 末端に FLAG タグが付加していることをを利用して、アフィニティ精製した。すなわち、培養上清をカラムに詰めた M2-agarose (Sigma 社製) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) / 150 mM NaCl (以下、TBS という) で洗浄した後、0.1 M Gly-HCl (pH 3.0) で、溶出、分画し、直ちに 1 M Tris-HCl (pH 8.0) で中和した。

(実施例 7-2) MDTs6TSP1 蛋白の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出

実施例 6 において、発現プラスミド導入後 12-16 時間で培地を無血清に置換した後、さらに 32-36 時間培養を継続し、培養上清を回収した。この培養上清と上記で調製した組換えアグリカンを混合し、37°C で 1 夜反応させ、SDS-PAGE 後、実施例 6 に記載した方法で、PVDF 膜に転写、ブロッキング後、抗 His₆ ポリクローナル抗体 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology 社製) 、西洋わさびペイオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (MBL 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム (アマシヤムファルマシア社製) を用いて組換えアグリカンを検出した。その結果、発現プラスミドのみを導入したコントロールではみられない組換えアグリカンの分解物が検出された (図 2)。

(実施例 7-3) 抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析

アグリカナーゼはアグリカンの Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間を選択的に切断する金属プロテアーゼである。この切断により生じた C 側のネオエピトープを認識する抗体を常法に従い、配列番号 32 で示される合成ペプチドと KLH とのコンジュゲートをマウスに 5 回免疫を繰り返すことにより調製した。実施例 7-2 と同様に転写、ブロッキングした PVDF 膜とこの抗体を反応させ、続いて、ペーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Tago 社製) と反応させた後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて検出した。その結果、MDTS6 により生じた組換えアグリカン G1G2 分解物が抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体と反応し、検出されたバンドの分子量は実施例 7-2 で検出された分解物の分子量と一致した (図 3)。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al. Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

(実施例 8) IL-1 による MDTS6 mRNA の発現誘導

マウス細胞株 ATDC5 はインスリン処理により軟骨様細胞へと分化することが知られている (Atsumi T. et al., Cell Differ. Dev. 30, 109-116, 1990)。I 型コラーゲンコート 6 ウエルプレート (旭テクノグラス社製) に ATDC5 細胞を 4×10^5 /well で蒔き、DMEM/HamF12 (1:1)/5%FCS 培地で 2 日間培養した後、インスリン (終濃度 30ng/ml)、50 μ g/ml L-アスコルビン酸含有 DMEM/HamF12 (1:1)/5%FCS 培地に交換し 5 日培養を継続し、IL-1 β (終濃度 5ng/ml) を添加して 0、1、2、4、8 時間処理した。各処理群より ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を調製し、その 1 μ g を鋳型として、BcaBESTTM RNA PCR Kit (宝酒造社製) を用い RT-PCR を行った。逆転写反応は添付の指示書に従い、Oligo dT-Adaptor primer をプライマーとして行い、PCR は MDTS6 の 3' 非翻訳領域の配列を基に合成した配列番号 15 および配列番号 16 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94°C 2 分の後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 40 回、続いて 72°C 7 分の反応で行った。反応液を 1%アガロ

-33-

ースにて電気泳動し、生成した約 0.3 kbp のバンドの濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1 により一過性に発現誘導されることが判明した（図 4）。

（実施例 9）MDTS6 による天然型アグリカン分解

（実施例 9-1）各種短長 MDTS6 蛋白の発現と組換えアグリカン G1G2 分解活性

pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENETM6

Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社製) に導入した。プラスミド導入後、1 夜培養後、PBS 緩衝液で洗い、無血清培地に交換し、さらに 2-3 日間培養した。この培養液を 9,000 rpm、10 分で遠心分離し、上清を MDTS6 の酵素源とした。この際、実施例 4 および実施例 5 で示した発現プラスミド以外に、各種短長 MDTS6 蛋白の発現プラスミドとして、配列番号 1 の 1 番から 447 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Pro とする）、配列番号 1 の 1 番から 518 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Dis とする）、配列番号 1 の 1 番から 687 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Cys とする）の 3 つの蛋白の発現プラスミドをデザインした。すなわち、MDTS6Cys の発現プラスミドは、実施例 5 で構築した全長蛋白発現プラスミドを鋳型、配列番号 7 と配列番号 17 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。また、MDTS6Pro の発現プラスミド、及び、MDTS6Dis の発現プラスミドは、上記 MDTS6Cys で作製したプラスミドと同様に作製し、具体的には PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。但し、PCR のプライマーとしては、MDTS6Pro の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 34 で示され

るオリゴ DNA を用い、MDTS6Dis の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 35 で示されるオリゴ DNA の組み合わせをそれぞれ用いた。

上述の各種 MDTS6 蛋白 (MDTS6Cys、MDTS6Pro、MDTS6Dis) の蛋白発現は、(実施例 6) に記載の MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現と同様に発現させた。上述の各種 MDTS6 蛋白のアグリカナーゼ活性を実施例 7-3 の方法で検討した結果、MDTS6Cys を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されたが、MDTS6Pro、MDTS6Dis を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されなかった。なお、発現された主要な蛋白の分子量はアミノ酸配列から計算される値よりも約 23K 小さく、実施例 6 で示された MDTS6TSP1 と同じく、furin プロテアーゼ認識配列でプロ領域が切断・除去された成熟蛋白であった。この結果、N 末から数えて 1 個目の TSP-1 繰り返し配列が MDTS6 のアグリカナーゼ活性の発揮に必須であることが判明した。

(実施例 9-2) 天然型アグリカンの分解

実施例 9-1 で調製した MDTS6 酵素液 90 μ l と天然型アグリカン(生化学工業社製) 10 μ g/10 μ l TBS を試験チューブ内で混合し、37°Cで一夜反応させた。この反応産物を SpeedVac にて乾燥した後、Chondroitinase ABC 0.06 単位(生化学工業社製)、keratanase I 0.024 単位(生化学工業社製)、keratanase II 0.0004 単位(生化学工業社製)、5 μ M PMSF、10mM EDTA を含む 10mM Tris-Acetate 緩衝液(pH7.6) 100 μ l に溶解し、37°Cで一夜反応させた。この反応液の一部を SDS-PAGE 後、実施例 7-3 に示す通りにマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した。この際、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体は Biosource 社製を用いた。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

その結果、MDTS6Cys では約 150KDa のバンドに加え、80-90KDa のバンドが検出された。この切断パターンはヒトの OA、RA を含む関節疾患患者の関節滑

液中に認められる主要な分子（いずれもアグリカナーゼ分解で生じた）のパターン (Sandy J. D. et al., J. Clin. Invest., 89, 1512-1516, 1992; Lohmander L. S. et al., Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993) に一致し、また、ヒト膝関節軟骨の器官培養系において IL-1、レチノイン酸処理 12-24 時間で生じる主要なアグリカナーゼネオエピトープを有する分子のパターン (Little C. B. et al., Biochemical J., 344, 61-68, 1999) に一致した(図 5)。

(実施例 10) アグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング系

(実施例 10-1) MDTs6Cys および基質の調製

MDTs6Cys は精製せずとも実施例 9-1 の方法で調整した培養上清で上記組換えアグリカン G1G2 および天然型アグリカンを Glu³⁷³-Ala³⁷⁴(以下, "aggrecanase site") の間を切断することを、実施例 9-2 に示したウエスタンプロティングを用いた方法で確認した。また、実施例 9-1 で無血清培地に置換せず、10%FBS 含有培地で培養を継続した培養上清を用いても、"aggrecanase site"での切断が認められた。そのため、基質としては実施例 7-1 で調製した組換えアグリカン G1G2 を用いた。

(実施例 10-2) スクリーニング系

組換えアグリカンおよび天然型アグリカンを基質に実施例 7-2 に示したウエスタンプロティングを用いた方法でスクリーニング可能であるが、より大量の被験化合物をスクリーニングするために下記の ELISA 系を構築した。

MDTs6Cys 培養上清、組換えアグリカン G1G2、被験化合物を混合し、37°C にて数時間反応させた産物を 96 穴プレート (Nunc-ImmunoTM Plate MaxiSorpTM Surface #439454; Nunc 社製) に吸着させ、1%BSA/TBS 液でブロッキングした後、マウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いて HRP コンジュゲート抗マウス IgG 抗体 (Biosource 社製) を反応させ、添付説明書の条件にしたがい TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad 社製) で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。また、その変法

として、組換えアグリカンを予め 96 穴プレート (Nunc 社製) に吸着させ、1%BSA/TBS 溶液でブロッキングした後、MDTS6Cys 培養上清と被験化合物を添加し、37°C にて数時間反応させた後、同様にマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いて HRP コンジュゲート抗マウス IgG 抗体 (Biosource 社製) を反応させ、TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad 社製) で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。アグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする基準は、阻害活性強度 (IC₅₀) において、好ましくは 10 μM 以下、さらに好ましくは 1.0 μM 以下である。

本スクリーニング系により、先に記載した化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D が選択することができた。アグリカナーゼ活性阻害強度 (IC₅₀) は、化合物 A では 0. 6 μM、化合物 B では 1. 0 μM、化合物 C では 2. 9 μM、化合物 D では 2. 7 μM を示した。

なお、化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D は先に示した PCT 公開番号 W090/05719 に記載された製造法と同様に合成された。それぞれの化合物のマススペクトルは以下の通りである。化合物 A は MS = 426 (MH⁺)、化合物 B は MS = 396 (MH⁺)、化合物 C は MS = 502 (MH⁺)、化合物 D は MS = 440 (MH⁺)。

(実施例 11)

(実施例 11-1) ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞の調製

ウサギ (日本白色種、オス、1.0~1.5kg) を過剰麻酔下で致死させた後、膝関節を摘出し、関節表面の軟骨層をメスにて剥離、細断した。さらに、トリプシン-EDTA (0.25%-1mM; GIBCO-BRL 社製) にて 37°C、1 時間処理の後、1500rpm、5 分の遠心分離し沈殿を DMEM で洗浄した。続いてコラゲナーゼ A (0.15%; ベーリンガー・マンハイム社製) /DMEM にて 37°C、3~4 時間処理した後、ナイロン

メッシュフィルター (100 μ m, Falcon 社製) 通過画分を 1500 rpm、5 分の遠心分離にかけ、軟骨細胞を沈殿させた。DMEM/10%FBS 培地で十分に洗浄した後、DMEM/10%FBS 培地に 2×10^5 cells/ml になるように懸濁し、I 型コラーゲンをコートした 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) に 200μ l/穴で蒔いた。3 日後に培地を 50μ g/ml アスコルビン酸含有 DMEM/10%FBS 培地 (以下、アスコルビン酸培地) 200μ l に交換し、さらに 3 日間培養した。I 型コラーゲンをコートした 6 穴プレート (旭テクノグラス) を用いる場合は、上記細胞懸濁液を $6 \text{ml}/\text{穴}$ で蒔き、同様に培地交換を行い培養した。これらの細胞を以下の実験に供した。

(実施例 11-2) ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解

実施例 11-1 で示した 96 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞を終濃度 10μ Ci/ml の $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 含有アスコルビン酸培地 200μ l にて 2 日間培養、標識した後、 200μ l のアスコルビン酸培地で 3 回洗浄し、 200μ l のアスコルビン酸培地で 1 日間培養した。IL-1 β および all-trans レチノイン酸で刺激し、0 時間後、24 時間後、48 時間後の培養上清を 20μ l ずつ回収し、トップカウント (Packard 社製) を用い、放射活性を計測した。その結果、 $0.01 \sim 10 \text{ng}/\text{ml}$ の IL-1 β で放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められ、 $0.1 \sim 10 \mu \text{M}$ の all-trans レチノイン酸で濃度依存的かつ強い放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められた (図 6)。

(実施例 11-3) MDT6 mRNA の発現誘導

実施例 11-1 で示した 6 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞をアスコルビン培地に交換しさらに 3 日間培養した後、 $10 \text{ng}/\text{ml}$ の IL-1 β もしくは $10 \mu \text{M}$ の all-trans レチノイン酸を添加し、2 時間後および 6 時間後の total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて添付の指示書に従い調製した。さらに、DNase I 処理 (ニッポンジーン社製) をを行い、フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿にて回収・精製した total RNA を DEPC 処理した滅菌水に溶解した。ランダムヘキサマーをプライマーとして、この total RNA $1 \mu \text{g}$ を

ThermoscriptTM RT-PCR System (GIBCO-BRL 社製カタログ番号 11146-016) を用い、添付の指示書に従い逆転写反応、RNase H処理を行ったものを滅菌水で 10 倍希釈し、cDNA サンプルとした。この cDNA サンプル各 5 μ l を鋳型、配列番号 18 および配列番号 19 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94°C 2 分の後、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 45 回、続いて 72°C 7 分の PCR 反応を行った。反応産物を 2% アガロースにて電気泳動し、生成した DNA 断片の濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1 β および all-trans レチノイン酸により発現誘導し、その発現強度は実施例 11-2 におけるプロテオグリカン分解の程度と相関した（図 7）。

（実施例 12）アグリカナーゼ活性を阻害する物質によるウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解抑制

実施例 10-2 のスクリーニング系により選択された化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D を実施例 11-1 で示したウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解系に 10 μ M の all-trans レチノイン酸刺激直前に添加し、その抑制作用を検討した。その結果、化合物 A 及び化合物 B は濃度依存的に抑制作用を示した（図 8）。化合物 C 及び化合物 D のプロテオグリカン分解抑制作用 (IC₅₀) は、化合物 C は 6.3 μ M、化合物 D は 4.1 μ M となった。一方、同じヒドロキサム酸骨格を持つがアグリカナーゼ活性阻害が弱い化合物では 100 μ M でもプロテオグリカンの分解抑制作用は認められなかった。

（実施例 13）MDTS6 プロモーター領域 DNA 配列の解析

MDTS6 のプロモーター領域に相当する DNA は GenomeWalker DNA Sca I Libraries (genome walkerTM Kits, CLONTECH 社カタログ番号 K1803-1) より、PCR 法を用いて増幅した。forward primer としてキット添付のアダプタープライマー AP-1 (配列番号 20)、AP-2 (配列番号 21) のオリゴ DNA を、reverse primer として配列番号 22、配列番号 23 のオリゴ DNA を用いた。具体的な方法はキットの添付説明書通りであるが、PCR には TAKARA LA Taq (TAKARA LA TaqTM、カタ

ログ番号 RR002A)を用いた。1回目のPCR反応はプライマーとして配列番号20と配列番号22のオリゴDNAを用い、98°C5秒、72°C3分のサイクルを7回、98°C5秒、67°C3分のサイクルを32回、67°C4分であった。2回目の反応は1回目の反応溶液をTE緩衝液(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)を用いて50倍希釈したもの5μlを鋳型、配列番号21と配列番号23のオリゴDNAをプライマーとして、上記と同じ条件で行った。増幅された約3.7 kbpのDNA断片を直接dideoxy terminator法によりABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc)にて配列解析した結果、解読できない2ヶ所のギャップで分断された約2.2 kbp, 0.36 kbp, 0.8 kbpのDNA配列が明らかになった。

次に、PCR増幅DNA断片の直接解析で解読できなかった2カ所のギャップ部の配列を判読するために、このDNA断片をサブクローニングして、DNAの塩基配列の決定を行った。その結果、該ギャップ部の配列は決定した8クローン(配列番号24、25、26、27、28、29、30及び31)で異なり、遺伝子多型の存在が示唆された。なお、クローニングベクターとしてはpZEr0™-2 vector(Zero Background/ Kan Cloning Kit, Invitrogen社製、カタログ番号K2600-01)を用いて、サブクローニングの操作は添付の説明書に従った。

上記DNA断片をレポータープラスミドpGV-B2(東洋インキ社製)のKpnI, XbaI部位に挿入したプラスミドをFuGene-6を用いHEK293細胞に導入し、通常の培養条件で28時間または48時間培養後のルシフェラーゼ活性を、PicaGene発色キット(東洋インキ社製、カタログ番号PGK-L100)を用いて測定した。この際、測定値は同時導入したβ-gal発現プラスミドpCH110(アマシャムファルマシアバイオテック社製、カタログ番号27-4508-01)より発現したβ-galの活性値で補正した。β-gal活性の測定はGalacto-Light Plusキット(TROPIX社製、カタログ番号BL300P)を用いた。その結果、もとのプラスミドであるpGV-B2では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな上昇が観察された。このことは上記DNA断片中にプロモーター活性が存在することを示している。

-40-

(実施例 14) 変形性関節症患者の関節組織での MDTS6 発現

変形性関節症患者の疾患部の膝関節軟骨より total RNA を調製し (Adams M. E. et al., Anal. Biochem., 202, 89-95, 1992) 、これを鑄型として実施例 11-3 に準じて RT-PCR を行うことにより、MDTS6 mRNA の存在を確認した。また、マウス抗ヒト MDTS6 特異的ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行い、滑膜組織およびマクロファージに MDTS6 蛋白の存在を確認した。

なお、マウス抗ヒト MDTS6 特異的ポリクローナル抗体は以下の如く調製した。まず、実施例 6 で調製したヒト MDTS6TSP1 蛋白を KLH とコンジュゲートし、マウスに 4-5 回免疫した後、抗血清を調製した。続いて、この抗血清より、Protein G Sepharase 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) を用い、添付指示書に従い、IgG を調製した。さらに、添付指示書に従い、ヒト MDTS6TSP1 蛋白を CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) に固定したカラムを作製した。このカラムに結合し、対応するヒト ADAMTS4TSP1 蛋白 (aggrecanase-1; Tortorella M. D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999) 、METH-1TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999) 、METH-2TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999) を固定したカラムに結合しない分画を調製した。

産業上の利用可能性

本発明で得られた「関節疾患アグリカナーゼ」は、アグリカナーゼ活性を有することより、該アグリカナーゼを有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該「関節疾患アグリカナーゼ」を有意に阻害する物質の医薬用途としては該アグリカナーゼ活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患であ

る関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子は、該遺伝子のプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）をスクリーニングに用いられることを特徴としてする。該プロモーター活性を阻害する物質の用途としては、プロモーター活性の阻害に起因する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患である関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。また、該プロモーター遺伝子には複数の変異体が存在することより、上記疾患との相関解析に用いられる。

請求の範囲

1. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
2. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
3. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
4. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲 4 に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. 請求の範囲 6 に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法。
8. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体。
9. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物。

-43-

ロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

1 0. 請求の範囲 1 乃至 3 に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

1 1. 配列番号 24、25、26、27、28、29、30 若しくは 31 で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物。

補正書の請求の範囲

[2001年4月19日(19.04.01)国際事務局受理:出願当初の請求の範囲1-4及び7-11は補正された;他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
2. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
3. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する、或いは、それぞれの配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び/または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
4. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲4に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲5に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. (補正後) 請求の範囲6に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの製造方法。
8. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼに対する抗体。
9. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金

属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

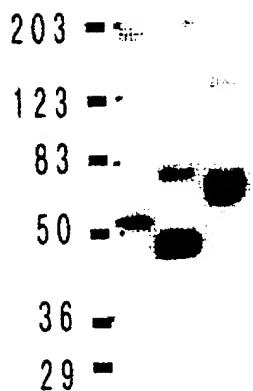
10. (補正後) 請求の範囲1乃至3に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼを阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

11. (補正後) 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、或いは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、関節疾患アグリカナーゼプロモーター活性を有する遺伝子。

1/8

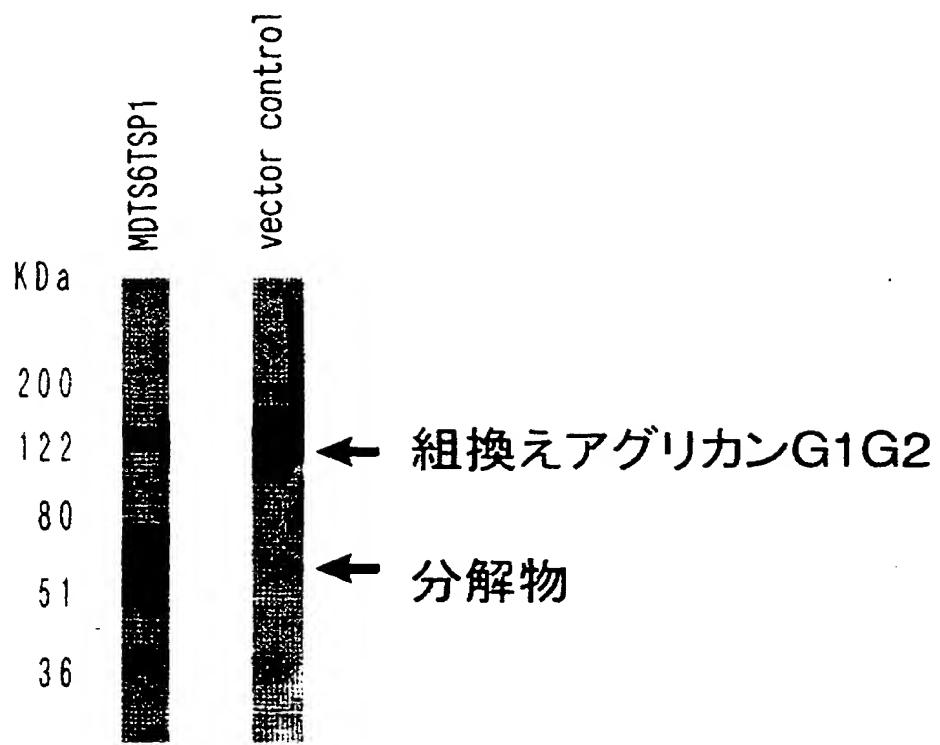
図 1

M.W.Marker
MDTS6TSP1
MDTS6Cys



差替え用紙 (規則26)

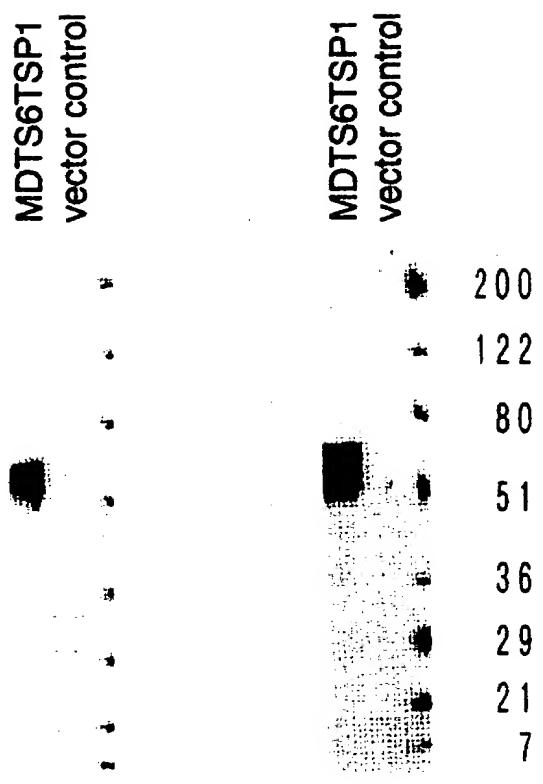
図 2



差替え用紙(規則26)

3/8

図 3



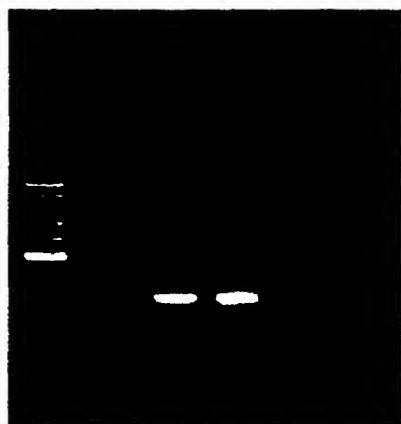
抗体 BC-3 P3

差替え用紙 (規則26)

4/8

図 4

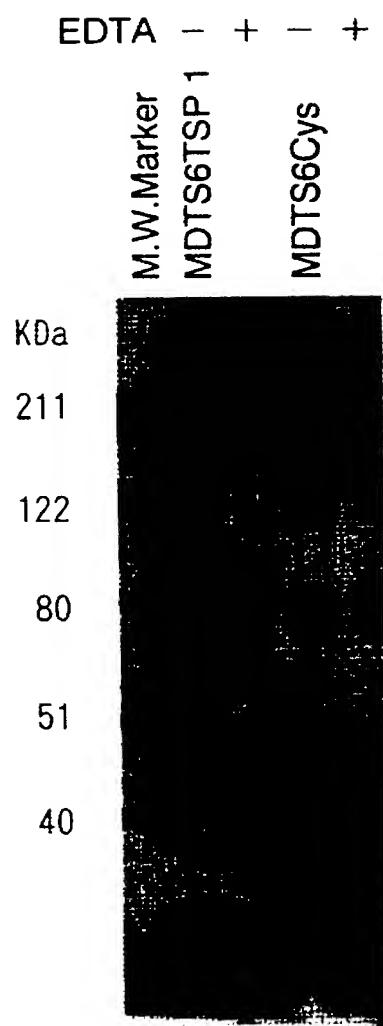
IL-1 处理 (時間) 0 1 2 4 8



孟醫文用紙(規則26)

5/8

図 5



差替え用紙 (規則26)

図 6

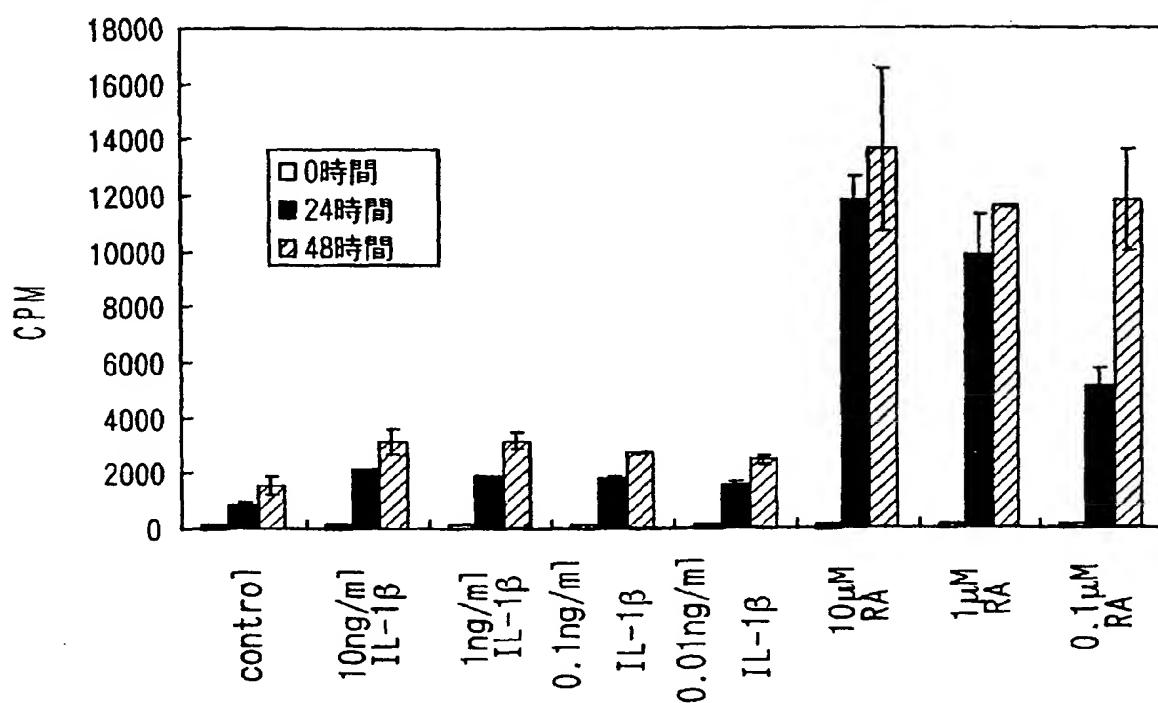


図 7

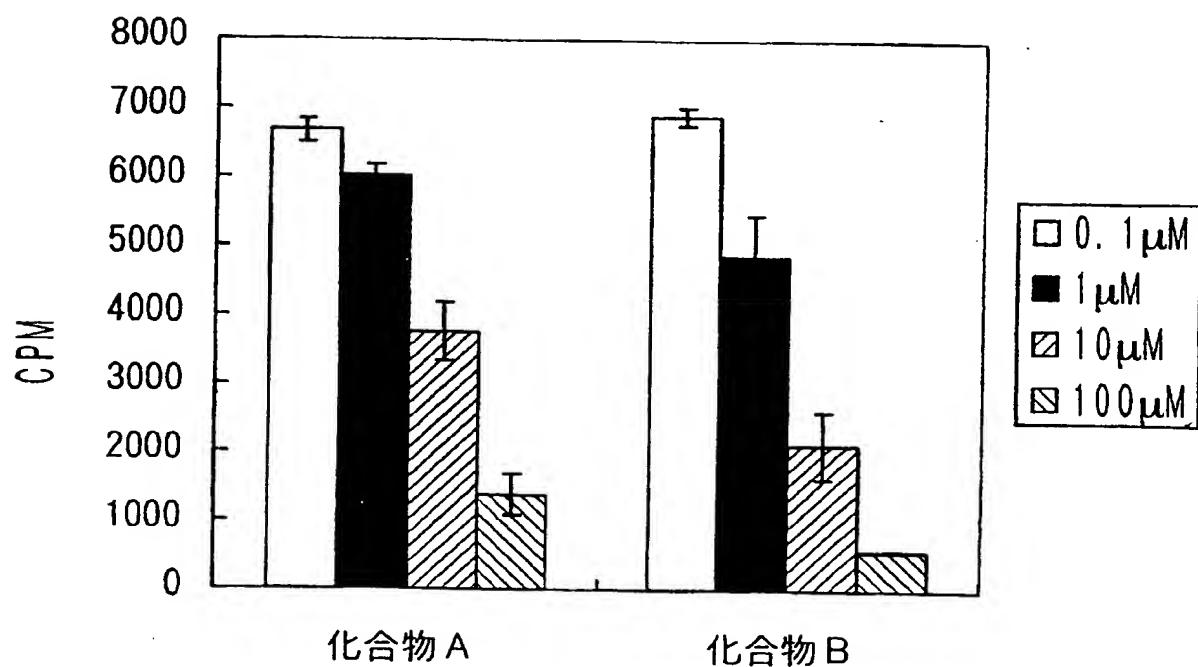
1 2 3 4 5



- 1: 非処理
- 2: IL-1 β 2時間処理
- 3: R.A. 2時間処理
- 4: IL-1 β 6時間処理
- 5: R.A. 6時間処理

差替え用紙 (規則26)

図 8



SEQUENCE LISTING

<110> Kazusa DNA Research Institute
Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel metalloprotease having an activity of aggrecanase

<130> YK0029

<140>

<141>

<150>JP 1999-321740

<151>1999-11-11

<150>JP 2000-144020

<151>2000-5-16

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1 5 10 15

Gly Gly Phe Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp

20 25 30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50 55 60

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser
65 70 75 80
Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly Leu Thr Gly Gly Ser Ser
85 90 95
Asp Leu Arg Arg Cys Phe Tyr Ser Gly Asp Val Asn Ala Glu Pro Asp
100 105 110
Ser Phe Ala Ala Val Ser Leu Cys Gly Gly Leu Arg Gly Ala Phe Gly
115 120 125
Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ile Ser Pro Leu Pro Asn Ala Ser Ala
130 135 140
Pro Ala Ala Gln Arg Asn Ser Gln Gly Ala His Leu Leu Gln Arg Arg
145 150 155 160
Gly Val Pro Gly Gly Pro Ser Gly Asp Pro Thr Ser Arg Cys Gly Val
165 170 175
Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg Ala Leu Asp Pro Tyr Lys
180 185 190
Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg Ser Arg Arg Arg Ser Gly
195 200 205
Arg Ala Lys Arg Phe Val Ser Ile Pro Arg Tyr Val Glu Thr Leu Val
210 215 220
Val Ala Asp Glu Ser Met Val Lys Phe His Gly Ala Asp Leu Glu His
225 230 235 240
Tyr Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ala Ala Arg Leu Tyr Arg His Pro
245 250 255
Ser Ile Leu Asn Pro Ile Asn Ile Val Val Val Lys Val Leu Leu
260 265 270
Arg Asp Arg Asp Ser Gly Pro Lys Val Thr Gly Asn Ala Ala Leu Thr
275 280 285
Leu Arg Asn Phe Cys Ala Trp Gln Lys Lys Leu Asn Lys Val Ser Asp
290 295 300
Lys His Pro Glu Tyr Trp Asp Thr Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp
305 310 315 320
Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly
325 330 335
Thr Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly
340 345 350

Leu Pro Ser Ala Phe Thr Thr Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn
355 360 365
Met Pro His Asp Asn Val Lys Val Cys Glu Glu Val Phe Gly Lys Leu
370 375 380
Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu Ile Gin Ile Asp Arg Ala
385 390 395 400
Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile Ile Thr Asp Phe Leu Asp
405 410 415
Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln Pro Ser Lys Pro Ile Ser
420 425 430
Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Gln Cys
435 440 445
Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro Cys Pro Tyr Met Gln Tyr
450 455 460
Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala Lys Gly Gln Met Val Cys
465 470 475 480
Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly
485 490 495
Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu Arg His Asn Leu Asn Lys
500 505 510
His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp Asp Pro Tyr Gly Pro Cys
515 520 525
Ser Arg Thr Cys Gly Gly Val Gln Leu Ala Arg Arg Gln Cys Thr
530 535 540
Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val
545 550 555 560
Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly
565 570 575
Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His
580 585 590
Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser
595 600 605
Gly Val Ser Pro Arg Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly
610 615 620
Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu
625 630 635 640

Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys
645 650 655
Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys
660 665 670
Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu
675 680 685
Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala
690 695 700
Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile
705 710 715 720
Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu
725 730 735
Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val
740 745 750
Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser
755 760 765
Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu
770 775 780
Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu
785 790 795 800
Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg
805 810 815
Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val
820 825 830
Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp
835 840 845
Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val
850 855 860
Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala
865 870 875 880
Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr
885 890 895
Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly
900 905 910
Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Arg Leu Leu
915 920 925

Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe

930 935

940

Cys Val Leu Arg Pro Cys

945 950

<210> 2

<211> 2853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgctttgc tggcatacct aaccctggct ttcgcgggc gaaccgctgg aggctttgag 60
ccagagcggg aggttgtcgt tccatccga ctggacccgg acattaacgg cgcggctac 120
tactggcggg gtcccggat ctcggggat cagggactca tttttcagat cacagcattt 180
caggaggact tttacctaca cctgacgccc gatgtcagt tcttggctcc cgccttctcc 240
actgagcatc tggcgtccc ctcggggat ctcaccggg gctcttcaga cctgcgacgc 300
tgcttctatt ctggggacgt gaacgccgag ccggactcgt tcgctgtgt gaggctgtgc 360
ggggggctcc gcggggccctt tggctaccga ggcggcggat atgtcattag cccgctgccc 420
aatgttagcg cggccggcggc gcagcgcaac agccaggcg cacacctct ccagcggcgg 480
ggtgttccgg gcggggccctt cggagacccc acctctcgct gcgggggtggc ctggggctgg 540
aaccggccca tccatccggc ctcggacccct tacaagccgc ggcggggccggg ctggggag 600
agtcttagcc ggcgcagggtc tggcgcgc aagcgtttcg tgtctatccc ggggtacgtg 660
gagacgttgg tggctcgga cggatcaatg gtcaagttcc acggcgcggg cctgaaacat 720
tatctgtga cgtgtgtggc aacggcggcg cgactctacc gccatcccag catctcaac 780
cccatcaaca tctttgtgtt caagggtctg ctcttagag atcggtactc cggggcccaag 840
gtcacccggca atgcggccct gacgtgcgc aacttctgtg ctcggcagaa gaagctgaac 900
aaagttagtg acaaggcaccc cggatctgg gacactgcca tccatccatc caggcaggac 960
ctgtgtggag ccaccacctt tgacaccctt ggcacggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020
cccaagagaa gctgtctgtt cattgaggac gatgggcttc catcagcctt caccactgcc 1080
cacgagctgg gccacgtgtt caacatgcc catgacaatg tgaaagtctg tgaggagggt 1140
tttgggaagc tccgagccaa ccacatgttgc tccctggaccc tcatccatc cggccgtgcc 1200
aaccggctggt cagccgtcag tgctgccttc atcaccgact tccctggacag cggccacgg 1260
gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc cggaggatct gcccggcc 1320
agctacaccc tggccagca gtgcgagctg gctttggcg tggctccaa gcccgtcct 1380
tacatgtcagt actgcaccaa gctgtgtgc accggaaagg ccaaggaca gatgggtgtgc 1440

cagacccgcc acttccctg ggccgatggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500
aaaggggct gcgtggagag acacaaccc aacaaggcaca gggtggatgg ttccctggcc 1560
aaatggatc cctatggccc ctgctcgcc acatgtggtg gggcgtgca gctggccagg 1620
aggcagtgc acaacccac ccctgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgggggtg 1680
aaataccgat cctgcaacct ggagccctgc cccagctcag cctccggaaa gagcttccgg 1740
gaggaggcagt gtgaggctt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctgc 1800
gtggcatggg tgcccaagta ctccggctg tctccccggg acaagtgc a gctcatctgc 1860
cgagccaaatg gcacigggcta ctctatgtg ctggcaccca aggtggtgga cggcacgctg 1920
tgctctccgt actccaccc cgtctgtgtc caaggcaagt gcatcaaggc tggctgtat 1980
gggaacctgg gctccaagaa gagattcgac aagtgtgggg tttgtggggg agacaataag 2040
agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagcccatgc atggctacaa tttgtggtg 2100
gccatcccc cagggccctc aagcatcgac atccggccgc gcggttacaa agggctgatc 2160
ggggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgct caacggcat 2220
ttcgtggtgt cggcggtgga gcgccgaccgg gtggtaagg gcagtctgct gcggtacagc 2280
ggcacggca cagcggtgga gagccctgcag gcttccggc ccatcctgga gccgctgacc 2340
gtggagggtcc tctccgtggg gaagatgaca ccgcgggggg tccgctactc ctctatctg 2400
cccaaagagc ctccggagga caagtccctc catcccaagg accccggggg accctctgtc 2460
ttgcacaaca gcgtccctcag cctctccaaac cagggtggagc agccggacga caggccccct 2520
gcacgctggg tggctggcag ctggggggccg tgctccgcga gctgcccgcag tggctgcag 2580
aagcgccgg tggactgccc gggctccgca gggcagcgca cggccctgc ctgtgatgca 2640
gccccatcgcc cctggagac acaagccctgc gggagccct gccccaccccg ggagctcagc 2700
gcctggtcac cctgctccaa gagctgcggc cggggatttc agaggcgctc actcaagtgt 2760
gtggccacg gaggccggct gctggccggg gaccagtgc a cttgcacccg caagccccag 2820
gagctggact tctgcgtccct gaggccgtgc tga 2853

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctagcgccgc cgcaggatcc gactacaagg acgacgtgc caaatgataa 50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatcttatca ttgtcatcg tcgccttgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggactagtc agaagctggg taccagctgc tagc 34

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ggactagtgt cgaccggtaa tggctgcgc 29

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gtgtctagag ccatgctttt gctgggcata ctaaccctgg ct 42

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

agagcggccg cctgctcctc ccggaagctc ttccggagg c 41

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aagcacaggg tggatggttc ctgggcc 27

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag 37

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

taggatccctt gttagaaactt cagaccatga caactcg 37

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggatccctc aatggtgatg gtgatgatga ccgaagcaga aggcatggtg ccgggacag 59

<210> 13

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

agcttgcac catgaagacg atcatgcgg tgagctacat cttctgcctg gtattgcgg 60
actacaagga cgtatgtac aagggatcc actagtc 97

<210> 14

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tcgagactag tggatccct tgtcatcatc gtcctttag tcggcgaata ccaggcagaa 60
gatgtagtc agggcgtatga tcgtttcat ggtggca 97

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

acctcagcag ccagctccct tgiatacaca 30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

cttgggggg atggaccaat acagctttgg 30

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

agagcggccg ctccagtcac cttcttgcag ctcttatt

38

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcggacgagt ccatggtcaa gttccac

27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ttctgccagg cgcagaagtt ggcgcgc

27

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

actatagggc acgcgtgg

19

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

actgagcatc cggcgtcagg tgttaggtaaa 30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

agtccctccgtt aatgtctgtt atctgtaaaa 30

<210> 24

<211> 3473

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 24

ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatattt gacctggtcg 120
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctt 180
gagctaggat aacccttctt ctttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgtatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgtt caacatatacc ctatgtcc 300
aattccctgg caaaagtgtat tggatgaaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttgcgtcaatgtt tagcacatac taaggctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgtca ggggtgagaa 480
tagctggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgcgtcagg 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600

taaaaacccat tgcaatccac cttaaaact gccgggtgt aaaaaacaat 660
tgcttcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttgc tctgcgttgc tcttaattt 720
taggcctctt ttgaacgctc aaacacacag ggccttgc agcttgact ccctgtctca 780
cacacagttc tcccataccc atacactctc ttcatgttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattt acataatgaa ttcatgttcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccttta tggggagaag ataatggca aaaagtgtc ttcatgtatg gaccgtccc 1020
agcctttctt ctccctggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cttaaaaaaa 1080
atccccaaat tctcccacat catccccctt atgcttaaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtccctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccccttggc tccagaaaga ttttcttaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctcccttctt ctcccttgct ttcccttgc tcaagagaaag 1260
aagttagtttgc tggggaggg taagaaggat cttgagggtct agagcctgaa aaactccctt 1320
ggctgttctc caaacttagat gggAACATAA ggtgcgatttgc catcttctcc agctgataact 1380
cactcgccctt cctatgcccag tccccagttc aggggttggc caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagccctggcc cgatTTTCTT actgttttgc ggaagacagc ctcttccctt 1500
tgtaaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctggc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcctgcccccc aaccccagct ctgatttgc tattcagggtg gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccatttgc atgtcccttgc ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattttta atatttccctt cacatttcca ccccatcttgc cacttttgc tgggagttgc 1740
tgtctcagag gtttggcggt tctgggtggc caagaccata agtaatttac aaataacttag 1800
gaagcgacgg gttttagtta tttattacct tttaaaaatgt tactttgtgg cttaggcattgg 1860
tggctcacgc ctgttagtccc cgacccggga ggccgaggtagtgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagccctggg caacacggcg aaacccagtc tctaccaaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacacat tggcttagcg 2040
tgggtgtcggt tgcgtgtggt cgcatgttact caggagacca aggttaggagg tagggaaacca 2100
aggtaggagg atcaccccgag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc 2160
ctgtctttac taaaaataca aaatttagctt ggcgtgggtgg tgcattgcctt taattccagc 2220
tacttggggag gctgagacag gagaatggct tgaacccggaa aggcggagg tgcgtgtgagc 2280
tgagatcgcg tcattgcact ccagccctggg caacaagagc aaaactccgt ctccaaaaaaa 2340
aagaaatata tatatatatgt tgcgtgtgtg tgcgtgtgtg tgcgtgtata tatatatatgt 2400
tatgtgtata tataatgtatgt tgcgtgtgtg tgcattatata tatatacact ttgttttaatt 2460
gtaaatgtgt ttagtttaat tttaataat gtcggtagttt aacagctggc tggcaagatt 2520
cctgagaact gaagagtttgc cccagccca tccagcacac catggggccca gggcagaccc 2580
tggggcttagg cggcttggg ttccagaggg ctcccatgcctt cctgtcttgc tgcattttctt 2640
gcaataggac atttacgcgg ggggggggggg tgggttttgc ttctgggtct ttttagggac 2700
tgcgtgtatata agaaacagca gggatgttgc aacagcaggg atgaggtggg cctggggac 2760

ggtcagtcaa gggcttcat tcctagctgc tgacctgata tgccctgaga taaaagacta 2820
agacccagag agtgaacgct gtccgcgggg gcagaagcga gtgaggcgta gggacagtgg 2880
ggcataacca agagcaaaac gcaaactgag acttcagcgc cggttctcg ggccagccca 2940
cgccctctgc cttagctcaa tgccactccc tccccgccaa gtggctctcc gctctggagg 3000
cgggaccgag ttctccggtg gccccggag gctccggcag cgactctgg gaggctggga 3060
ggggagttag gggagggcgc ctgactggc cgtccaaaga ggagggggcc tttataggg 3120
tcgcccagcg cctggcttgc tgctgtgcga gtggctgcgg ttgcgagaag ccgcccggca 3180
cctccgcta gttctcgct gcaaatttc gtccttgac ttgacagcga ttgtacttaa 3240
gtccccaggg cgcgccttgc ttggaaaggc acaggtagga agcgcggct gccgggtgca 3300
cgctcgccgc cctgggagga gtctccctcc ttggctctc ctttctggga actgccggct 3360
gtcccgtac gttggcggtt ccagagtgcg ggctgtcacgg agaccgcggc agcggccggaa 3420
gagcccgcc cagcccttc ccacagcgcg gcggtgct gccccggcc atg 3473

<210> 25

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 25

ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tggatattt gacctggctg 120
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aacccttct ctttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgcata 240
gtggatgtgcc aatcctgagt atcacccctca ctcaagtgc caacatacc ctatcc 300
aattccctgg caaaagttagt tggatggAAC cacaggcttc caagagggga cagtcagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataaacttttgc gtgcatttt tagcacatac taaggctgca 420
atacatgcta atcccttttgc gcaaattccac atggccagtt tctgtgcgtca ggggtgagaa 480
tagctggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg aggacttcc tgtctcagg 540
ccctgcccattt tgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600
taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac cttaaaact gcccgggtca gtaaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga ctatcattt ctgttggttgc tctgcgttcc tcttaatta 720
tagccctctt ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgtta agcttgcact ccctgtctca 780

cacacagtc tccatataccc atacactctc ttcatatgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa ttcatgtcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atctcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccctta tggggagaag ataatggca aaaagtgc ttcactgtat gaccgtccc 1020
agcctttct ctccttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctccacat catccctt atgcctaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtccccc tctgcaaac tcaactcaga gccccttggc tccagaaaga ttttcttaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag ctccttcct ctccttgct ttccttcctg tcagagaaag 1260
aagtgttgc tgcggagagg taagaaggat cttagggtct agggctgaa aaactccctg 1320
ggctgttctc caaacttagat gggAACATAA ggtgcgattt catcttcctc agctgatact 1380
caactcggcct cctatgccag tccccagttc agggtttggt caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgattttct actgtttgtt ggaagacagc ctcttcctc 1500
tgtaactgca gcccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggttag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcctgcccc aaccccaagct ctgattttgtt tattcaggtg gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccatttgatg atgtccctgaa ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatccctt cacatttcca ccccatctg cacttttctc tggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggt tctggtggtt caagaccata agtaattatc aaataacttag 1800
gaagcgacgg gttttagtta ttattacct tttaaaaatg tactttgtt ctaggcattgg 1860
tggctcacgc ctgttagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggatttc ttgagctcag 1920
gagttaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac aaattggcct agcgtgggt 2040
cgtgtgtctg tggtcgcagt tactcaggag accaaggtag gaggttaggaa accaaggtag 2100
gaggatcacc cgaggtcggt agttcggagac cagccctgacc aacatggaga aacccctgtct 2160
ttactaaaaa tacaattatc gctggcggtt gtggtgcatg cctgttaatc cagctacttg 2220
ggaggctgag acaggagaat ggcttgaacc cggaaggcgg agtttgcgtt gagctgagat 2280
cgcgtcattt cactccagcc tggcaacaa gagcaaaact ccgtctcaaa aaaaaagaaaa 2340
tatatatata tatgtgtgtg tgggtgtgtg tgggtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400
tatatatatg tatgtgtgtg tgggtgtatg tatatatata cactttgtt aattgttaatg 2460
gtgttttagtt taatttttaa taatgtccgt gattaacagc tggctggcaa gattcctgag 2520
aactgaagag ttggccctt cccatccagc acaccatggg cccagggcag accttggggc 2580
taggcggtct tgggttccag agggctccca tggccctgtc ctatgtctt tctggcaata 2640
ggacattttac gcgggggggg ggggtgggtt tggattctgg gtcttttagg ggactctgt 2700
attaagaaac agcagggtat ttgcaacagc agggatgagg tggccctggg gacgggtcag 2760
tgaaggggtct tcattccctag ctgctgaccc tgcgtccctt gagataaaag actaagaccc 2820
agagagtgaa cgctgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880
accaagagca aaacgcacaaac tgagacttca ggcgggtt ctcggggccag cccacgcctc 2940

ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgctctg gaggcgggac 3000
cgagttctcc ggggccccct ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060
tgaggggagg ggcgctgact gggccgtcca aagaggaggg ggccttaat aggctcgccc 3120
agcgcctggc ttgtcgcgct gcgagtggt gcgggtgcga gaagccgccc ggcacccccc 3180
gctagttctc ggctgcaaat cttcgccctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240
agggcgcgti ttgttggaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctggccgg tgcacgctcg 3300
ccgccttggg aggagtctcc ctcccttggc tctccttct gggaaactgcc ggctgtcccg 3360
tagcgttggc ggttccagag tgccggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagcccc 3420
ggccccagccc ctccccacag cgcggcggtg cgctggccgg cgccatg 3467

<210> 26

<211> 3464

<212> DNA

〈213〉 *Homo sapiens*

〈220〉

<221> promoter

〈222〉

<400> 26

ttgcacagct aagaatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgtaatattt gacctggctg 120
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagcttaggat aacccttctt ctttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgcata 240
gtggagtgcc aatccctgagt atcacctcta ctcaagtgc 300
aattccctgg caaaaatgtat tggatggAAC cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaaatacga gaatgcacat ataacttttgc gtgcaatgtt tagcacatac taaggcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgc 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgcgtcagg 540
ccctgcccattc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600
taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac cttaaaaact gcccgggtgtta gtaaaaacaat 660
tgcttgc 720
taggcctct ttgaaacgc 780
cacacagtc 840
tcactcattc 900
gaattatggg 960

ggatccctta tggggagaag ataatggca aaaagtgc ttcactgatg gaccagtccc 1020
agccctttct ctccctggac aatagagttc ttcccttcaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctcccacat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ccccttctt 1140
tgtccctcccc tcttgcacaa tcaactcaga gcccttggc tccagaaaga tttcttaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat ctgagggtct agagcctgaa aaactcccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggAACATAA ggtgcgttgc catcttcctcc agctgataact 1380
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggcttgcgtt caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagccctggcc cgatTTTCTC actgtttgtt ggaagacagc ctcttcctct 1500
tgtaactgca gccccagaaac ctgatctcca catccctggc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggcctcatct tcctggccccc aaccccaagct ctgatttgc tattcagggtg gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttcctt cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggt tctgggtgtt caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttagtta tttaaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgttagtccc cgcaccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccccaagtc tctaccaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtgggtgc 2040
tgtgtctgtg gtcgcagttt ctcaggagac caaggttagga ggttagaaac caaggttagga 2100
ggatcacccg aggtcggttag ttcgagacca gcctgaccaa catggagaaa ccctgtctt 2160
actaaaaata caaaatttgc tggcggtgtt ggtgcacgttca gctacttggg 2220
aggctgagac aggagaatgg cttaaccccg gaaggcggag ttgcgggtga gctgagatcg 2280
cgtcattgca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtctcaaaaaaaa aaaagaaata 2340
tatatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtatg tatatatata tatgtatgt 2400
tatatatata tatgtgtgtg tgtgtgcata tatatatata ctttgtttaa tigttaagtgt 2460
gttttagtttta attttaata atgtccgtga ttaacagctg gctggcaaga ttcctgagaa 2520
ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac ctggggccta 2580
ggcggcttgc ggttccagag ggctcccatg cccctgtcctt attgctcttc tggcaatagg 2640
acatttacgc ggggggggggg gtttttttttgc attctgggtc ttttagggga ctctgtgatt 2700
aagaaaacgc agggatgttg caacacggcagg gatgaggagg ggctggggac gggtcagtg 2760
agggcttca ttccctagctg ctgcacgtat ctgccttgcgat ataaaagact aagacccaga 2820
gagtgaacgc tttcccgcccc ggcagaagcg agtggggcgt cgggacagtg gggcataacc 2880
aagagcaaaa cgcaaaactga gacttcagcg ccggtttctc gggccagccc acgcctccctg 2940
cctcagctca atgccactcc ctccccggca agtggcttc cgccttggag gcgggaccga 3000
gttctccgggtt ggcccttggaa ggctccggca gcgagcttgc ggaggctggg aggggagtg 3060
ggggaggggc gctgacttggg ccgtccaaag aggagggggc cttaatagg ctgcggccagc 3120

gcctggcttg ctgcgtcg agtggctcg gttgcgagaa gccgccccggc accttccgct 3180
agttctcgcc tgcaaatttt cgtcccttgc cttgacagcg attgtactta agctcccgagg 3240
gcgcgctttg cttggaaagg cacaggttagg aagcgcgggc tgccgggtgc acgctcgccg 3300
ccctgggagg agtctccctc ccttggctct ccttcttggg aactgcgcggc tgtcccgtag 3360
cgttggcggt tccagagtgc gggctgcacg gagaccgcgg cagcggccgg agagccccggc 3420
ccagccccctt cccacagcgc ggcgggtgc tgccggcgc catg 3464

<210> 27

<211> 3469

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

〈222〉

〈400〉 27

ttgcacact aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tctaataattt gaccgtgtcg 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagcttaggat aacccttctt ctttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgcata 240
gtggagtgcc aatccctgagt atcacctcta ctcaagtgc tcaacatatcc ctagatcc 300
aattccccgg caaaagtgtat tggatggAAC cacaggcttc caagagggga cagtcagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttgc gtgcaatgtt tagcacatac taaggctgca 420
atacatgctt atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgcica ggggtgagaa 480
tagctggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcagg 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600
taaagtgcgg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaaact gccgggtgtt gtaaaaacaat 660
tgcttggccc aaataaaatga cttatcatttgc ctgttgggttgc tctgcgtttc tcttttaattt 720
taggcctct ttgaacgcgc aaacacacag ggcctttgtt agcttgaact ccctgtctca 780
cacacagtcc tcccatatccc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattt acataatgaa tttcagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg cacttgagcc atcttcatgt tccaaaggccc cagggggcgc ttccaaagagt 960
ggatccctta tggggagaag ataatggc aaaaagtgc ttcacatgtt gaccgtcccc 1020
agccctttctt ctcccttggac aatagaggttc ttcccttigaa cagccacttc cttaaaaaaa 1080
attccaaaaat tctcccatat cccccctttt atgtttttttt tcatcacaca cttcccttctt 1140

tgtccccc tcttgcAAC tcaactcaga gcccTTggc tccagaaaAGA ttttctAGGT 1200
atcaggagAG agtagcaAAg cctccctcCT ctcTTgcCT ttctccCTtG tcagagaaAG 1260
aagtGATTc tgcggagAGG taagaaggat cttgaggTCT agagcctgAA aaactcCTtG 1320
ggctGTTcTC caaactAGat gggAACataA ggtgcGATTG catcttCTcC agctgataACT 1380
cactcggcCT cctatGCCAG tccccAGicC aggGTTtGgt caagggtCAA atgagataAAT 1440
ttcaTggagg aaggcCTggCC cgattttCT actgtttGCT ggaagacAGC ctcttCCtCT 1500
tgtaactgca gccccAGAAC ctgatCTCCA catccCTGCC aggcaGGtag ctgtgtacAA 1560
gggcTcatCT tccTgcccc aacccAGCT ctgatTTGCT tattcaggTG gtgtAAataAC 1620
ttctaccagg acctatttCA agccATTGtG atgtccCTGA ctggggAGAT gcagggcAGC 1680
acaccatTTA atatttCCt cacatTTCA ccccaTTCTG cactCTTTC tgggAGtGc 1740
tgtctcAGAG ggTTggcGgt tctggTggCT caagACCATA agtaattATC aaataCTtag 1800
gaagcGacGG gTTTgAGtA tttattACt tttaaaATG tacTTGTgg ctaggcatGG 1860
tggctcacGC ctgtAGTccc CGCACCGGGA ggCCGAGGTG ggtggATTGc ttgagCTcAG 1920
gagtTcaAGA ccAGCCTGGG caacacGGCG aaACCCAGtC tctaccaAAA atacacacAC 1980
acacacacAC acacacacAC acacacacAC acacacacAC acaaATTGGC ctAGCgtGgt 2040
gtcgtGtGtC tgggtGcA gttactcagg agaccaAGgt aggaggtagg aaaccaAGgt 2100
aggaggatCA cccgaggTCG gttagtCAG accAGCCTGA ccaacatGGA gaaACCCtGt 2160
cttactAAA aatacaAAA tagctggcG tggTggTgCA tgcCTgtaAT tccagCTact 2220
tggaggCTG agacaggAGA atggcttGAA cccGGAAGGC ggagTTGCG gtgagCTgAG 2280
atcgcGtcat tgcactCCAG CCTGGGCAAC aagAGCAAA ctccGtCTCA aaaaaAAAGA 2340
aatatata tataTGtGtG tGTGtGtGtG tGTGtGtGtA tGTatatata tataTGtAtG 2400
tGTatatata tGTatGtGtG tGTGtGtGCA tataTata tacaCTtGt ttaattGtaA 2460
gtgtGTTAG ttaattttt aataatGtCC gtGATTAACA gctggCTGGC aagatTCCTG 2520
agaactGAAG agTTTGCccc agccCAtCA GCACACCATG ggCCCAggGC agacCTTGGG 2580
gctaggcGgt ctTggGTTCC agaggGCTCC catGCCCTG tcctattGCT ctTCTGGCAA 2640
taggacATTt acGCGGGGGG gggggGTGt tcttGATtCT ggGTCTTTA gggGACTCTG 2700
tgattaAGAA acAGCAGGGA tGTTGCAACA GCAGGGATGA ggtggGCTG gggACGGGtC 2760
agtGAAGGGt ctTcATTCCt agCTGtGtAC ctGATCTGCC ctGAGATAAA agactaAGAC 2820
ccAGAGAGtG aacGCTGtCC gCGGGGGCAG aAGCAGtGA ggcGtGGGA cAGTGGGGCA 2880
taaccaAGAG caAAACGCAA actGAGACTT cAGCgCCGGt ttCTCGGGCC agCCCAcGcC 2940
tcctGCTCA gctcaATGtCC actCCCTCC CGCCAAgTGG ctCTCCGtC tggaggCGGG 3000
accGAGtTCT ccGGTGGCCC ctggaggCTC CGGCAgCAG ctCTGGGAGG ctGGGAGGGG 3060
agtGAGGGGA gggGCGtGA ctggGCCGtC caaAGAGGGAG gggGCTTTA ataggCTGc 3120
ccAGCGCTGtGtG ctTtGCTGCG ctGCGAGTGG ctGCGGTTGc gagaAGCCGc CGGCAcCT 3180
ccGCTAGtTC tCGGCTGCAA atCTCGtCC tTGCACTGA cAGCgATTGt acttaAGCTC 3240
ccAGGGCGCG ctTtGCTTGG aaAGGCAcAG gtagGAAGCG CGGGCTGCCG ggtGcACGcT 3300

```
cgccggccctg ggaggagtct ccctcccttg gcctcccttt ctgggaactg ccggctgtcc 3360
cgttagcgtttg gcgggttccag agtgcgggct gcacggagac cgccggcagcg gccggagagc 3420
ccggccccagc cccttccccac agcgcgccgg tgcgctgccc ggcgcccattg 3469
```

〈210〉 28

<211> 3470

<212> DNA

213 <213> Homo sapiens

〈220〉

<221> promoter

<222>

<400> 28

ttgcacagct aagatctgggt ggagggcatgc acacaggggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatattt gaccctggtcg 120
ttatctiagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat acccccttcctc ttttgacaga cgagtcagag aatcagatca gtgatagaag 240
tggagtgcca atccctgagta tcacccctcac tcaagtgcctc aacataatccc tagatccctca 300
atccctggc aaaagtgtatt ggatggaacc acaggcttc aagaggggac agtcaagcat 360
taaatacgag aatgcacata taactcttgg tgcaatgttt agcacatact aagccctgcaa 420
tacatgtctaa tccctttgag caaatccaca tggccagttt ctgtgctcag gggtgagaat 480
agctgggctg tgattggggc agggggagca ciaagtggga gggacttcct gtctcaggc 540
cctgcccattct tgactgacat gctgcagccc ttgccaaaac ccatgggtca gaatgaaaagt 600
aaagtggcgt tgaaaacctt gcaatccacc tttaaaactg ccgggtgttag taaaacaatt 660
gcttgccccca aataaatgac ttatcattgc tttgtgttgc ctgcgtttct cttaattat 720
aggccctctt tgaacgctca aacacacagg gccttgcata gcttgaactc cctgtctcac 780
acacagtccct cccataaccca tacactctct ttcatgtca gagtataaac acccatctct 840
cactcattca cataatgaat ttcatgtccct tttgtccaa tcaaggagag gcctcactgg 900
aattatggc atctgagcca tcttcattgtt ccaaggcccc agggggcgct tccaagagtg 960
gatcctttat ggggagaaga taatggcaaa aatgtctct tcactgtatgg accagtc 1020
gcctttctc tccctggaca atagagtct tccctgtca agccacttc ctaaaaaaaa 1080
ttccaaaatt ctccccacatc atccccctta tgcttaaaat catcacacac tcccttctt 1140
gtcctccctt cttgcacttcaactcagag cccttggct ccagaaaagat tttcttaggt 1200
tcaggagaga gtagcaaagc ctccctccctc tccttgcctt tccttcgtt cagagaaaaga 1260
agttgattct gcggagaggt aagaaggatc ttgagggtcta gagcctgaaa aactcccttgg 1320

gctgtttctcc aaactagatg ggaacataag gtgcgattgc atcttctcca gctgatactc 1380
actcggcctc ctatgccagt cccccagtcca gggtttggtc aagggtcaaa tgagataatt 1440
tcatggagga agcctggccc gatTTTctta ctgtttgtc gaagacagcc tcttcccttt 1500
gtaaactgcag ccccaagaacc tgatctccac atccctgcca ggcaggttagc tgtgtacaag 1560
ggctcatctt cctgccccca accccagctc tgatTTgtt attcaggtagg tgtaaaact 1620
tciaccagga cctatttcaa gccattgtga tgtccctgac tggggagatg cagggcagca 1680
caccatttaa tatttccctc acatttccac cccattctgc actctttct gggagttgct 1740
gtctcagagg gtggcggtt ctggggctc aagaccataa gtaattatca aatactttagg 1800
aagcgacggg ttttagtat ttattacctt ttaaaaatgt actttgtggc taggcattgtt 1860
ggctcacgcc ttagtcccc gcaccgggag gccgaggtagg gtggattgct tgagctcagg 1920
agttcaagac cagccctggc aacacggcga aaccaggctc ctaccaaaaa tacacacaca 1980
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca caaattggcc tagcgtggtg 2040
tcgtgtctt gtggtcgcag ttactcagga gaccaaggta ggaggttagga aaccaaggta 2100
ggaggatcac ccgaggcgg tagttcggaga ccagccgtac caacatggag aaaccctgtc 2160
tttactaaaa atacaaaatt agctggcgt ggtggtgcat gcctgttaatt ccagctactt 2220
gggaggctga gacaggagaa tggcttgaac ccggaaaggcg gagtttgcgg tgagctgaga 2280
tcgcgtcatt gcactccagc ctggcaaca agagcaaaac tccgtctcaa aaaaaaagaa 2340
atatatatat atatgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat gtatatatat atatgtatgt 2400
gtatatatat gtatgtgtgt gtgtgtgtcat atatatatat acactttgtt taatgttaag 2460
tgtgttttagt ttaatttta ataatgtccg tgattaacag ctggctggca agattcctga 2520
gaactgaaga gtttggccca gccccatccag cacaccatgg gcccaggcga gaccttgggg 2580
ctaggcggtc ttgggttcca gagggctccc atgcccctgt cctattgtc ttctggcaat 2640
aggacattta cgcccccccc ggggggggtgg ttcttgattc tgggtcttt agggactct 2700
gtgattaaga aacagcaggaa atgttgcaac agcaggatg aggtgggcct ggggacgggt 2760
cagtgaaggg tcttcattcc tagctgctga cctgatctgc cctgagataa aagactaaga 2820
cccagagagt gaacgctgtc cgcggggcga gaagcgagtg aggcgctggg acagttgggc 2880
ataaccaaga gcaaaacgca aactgagact tcagcgccgg ttcttcggc cagcccacgc 2940
ctccctgcctc agctcaatgc cactccctcc ccggccaagtg gctctccgct ctggaggcgg 3000
gaccgagttc tccggtgcc cctggaggct ccggcagcga gctctggag gctgggaggg 3060
gagtgagggg agggcgctg actggccgt ccaaagagga gggggccttt aataggctcg 3120
cccagcgccct ggcttgcgtc gctgcgagtg gctgcgggtt cgagaagccg cccggcacct 3180
tccgctagtt ctggctgca aatcttcgtc cttgcacttg acagcgattt tacttaagct 3240
cccagggcgc gcttgcgtt gaaaggcaca ggttaggaagc gcgggcgtcc gggggcacgc 3300
tcgcccgcctt gggaggagtc tccctccctt ggctctccctt tctggaaact gccggctgtc 3360
ccgttagcggtt ggccgttcca gagtgcgggc tgcacggaga ccgcggcagc gcccggagag 3420
cccgcccccag ccccttccca cagcgcggcgt gtgcgctgccc cggcgccatg 3470

<210> 29
<211> 3467
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> promoter
<222>

tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggcctcatct tcctgcccc aaccccgact ctgatttgc tattcaggtg gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactctttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcgtt tctgggtgc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gtttigaga ttatattacct tttaaaaatg tactttgtgg cttaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgttagtccc cgacccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagccctggg caacacggcg aaacccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc cttagcgttgtt 2040
gtcgtgtgtc tgggtgcga gttactcagg agaccaaggtt aggaggttagg aaaccaaggtt 2100
aggaggatca cccgagggtcg gtagttcgag accagcctga ccaacatggaa gaaaccctgt 2160
ctttactaaa aatacaaaaat tagctggcgtt tgggtggcga tgcctgtat tccagctact 2220
tgggaggctg agacaggaga atggcttgcgaa cccggaaggc ggagttgcg gtgagctgag 2280
atcgcgtcat tgcactccag cctggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaaaaaga 2340
aatatatata tataatgtgtg tgggtgtgtg tgggtgtgtg tatgtatata tataatgtata 2400
tgtgtatata tatgtatgtg tgggtgtgtg catatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460
gtgtgttttag tttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg 2520
agaactgaag agtttgcggcc agcccatcca gcacaccatg ggcccgaggc agaccttggg 2580
gcttagggcgtt cttgggttcc agagggctcc catgcccctg tcctattgct cttctggcaa 2640
taggacattt acgcgggggg ggggtgggttc ttgattctgg gtcttttagg ggactctgtg 2700
attaaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tggcctggg gacgggtcag 2760
tgaagggtct tcattccctag ctgctgaccc tgcatttgcctt gagataaaaag actaagaccc 2820
agagagtgaa cgctgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880
accaagagca aaacgcacaaac tgagacttca gcgcgggtt ctgcggccag cccacgcctc 2940
ctgcctcagc tcaatggccac tccctccccg ccaagttggct ctccgtctg gaggcgggac 3000
cgagttctcc ggtggccct ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060
tgaggggagg ggcgttgact gggccgtccaa aagaggaggg ggccttaat aggctcgccc 3120
agcgcctggc ttgcgtgcgt gcgagtggct gcgggtgcga gaagccgccc ggcacccctcc 3180
gcttagttctc ggctgcaaat ctgcgtccctt gcacttgcata gcgattgtac ttaagctccc 3240
agggcgcgtt ttgcgttggaa aggcacaggtt aggaagcgcg ggctggcggg tgacgcgtcg 3300
ccgcctggg aggagtctcc ctcccttggc tctcccttctt gggaaactgccc ggctgtcccg 3360
tagcgttggc ggttccagag tgcggctgc acggagaccc cgccagcggc cggagagccc 3420
ggcccgcccc cttccacacag cgccggcgttgc cgctgcccgg cgccatg 3467

<210> 30

<211> 3462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 30

ttgcacagct aagatctgggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatattt gacctggtcg 120
ttatcttagg tattatcttag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagcttagat aacccttctt cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgcata 240
gtggagtgcc aatccgtact atcacctcta ctcaagtgtct caacatatcc ctagatcc 300
aattccctgg caaaagtgtat tggatggAAC cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taaggctgca 420
atacatgcta atcccttiga gcaaattccac atggccagtt tctgtgtca ggggtgagaa 480
tagctggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgcgtcagg 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac cttaaaaact gcccgggtgtaa 660
tgcttgcccc aaataaaatga cttatcattt ctgttgggtt tctgtgtcc tctttat 720
taggcctctt ttgaacgcctc aaacacacag ggcctttgtt agcttgcactt ccctgtctca 780
cacacagtcc tcccataccat atacactctc ttcatgttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattt acataatgaa ttcatgttcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactt 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccctta tggggagaag ataatggca aaaagtgcctc ttcatgttgc gaccagtccc 1020
agccctttctt ctcccttggac aatagagtcc ttcccttggaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
atccaaaat tctccacat catccctttt atgttttttca tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtccctcccc tcttgcaac tcaactcaga gccccttggc tccagaaaga ttttcttaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctcccttctt ctcccttggc ttctcccttgc tcaagagaaag 1260
aaggtagttc tgcggagagg taagaaggat ctggggatctc agagccgttcaaa 1320
ggctgttctc caaacttagat gggAACatca ggtgcgttttgc catcttctcc agctgtataact 1380
cactcggctt cctatgccag tccccacttcc agggttttgtt caaggggtcaaa atgagataat 1440
ttcatggagg aaggccctggcc cgtttttctt actgttttgc ggaagacagc ctcccttctt 1500
tgtaactgca gccccagaaac ctgatctcca catccctgccc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggcctcatct tccctggcccc aacccttggatctt ctgttttgc ttttgcgttgc ttttgcgttgc 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgttgc atgtcccttgc ctggggagat gcagggcagc 1680

acaccatatttccct cacatttcca cccattctg cacttttc tgggagttgc 1740
tgtctcgag ggttggcggt tctggggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttagtta tttattaccc tttaaaaatg tactttgtgg cttaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgttagtccc cgccacccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttagactcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtgggtcgc 2040
tgtgtctgtg gtgcagttt ctcaggagac caaggtagga ggttaggaaac caaggtagga 2100
ggatcacccg aggtcgtag ttcgagacca gcctgaccaa catggagaaa ccctgtctt 2160
actaaaaata caaaaattagc tggcggtgg tggcatgcc tggatattcca gctacttggg 2220
aggctgagac aggagaatgg cttaacccg gaaggcggag ttgcggtga gctgagatcg 2280
cgtcatttgc ctccagccctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtctaaaaaa aaaagaaaata 2340
tatatatata tgtgtgtgt tgtgtgtgt tgtgtatgtatata tataatataata tgtatgtgt 2400
tatatatatgtatata tgtgtgtgt tgtgtatata tataatataaca ctgttttaa ttgtaaatgt 2460
gttttagtttta atttttaata atgtccgtga ttaacagctg gctggcaaga ttccctgagaa 2520
ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac ctggggcta 2580
ggcggcttgg ggttccagag ggctcccatg cccctgtccct attgtcttc tggcaatagg 2640
acattttacgc ggggggggtt ggttcttgat tctgggtctt ttaggggact ctgtgattaa 2700
gaaacagcag ggttgggttgc acagcagggta tgaggtggc ctggggacgg gtcagtgaag 2760
ggtcttcatt cctagctgt gacctgtatct gcccctgagat aaaagactaa gaccctgagaga 2820
gtgaacgcgt tccgggggg cagaagcgag tgaggcgtcg ggacagtggg gcataaccaa 2880
gagcaaaacg caaaactgaga ctgcggcc ggttctcggtt gcccggccac gcctccctgcc 2940
tcagctcaat gcccactccct ccccgccaaag tggctctccg ctctggaggc gggaccgagt 3000
tctccgggtgg cccctggagg ctccggcgc gacccgttggg aggctgggag gggagtggg 3060
ggagggggcgc tgactgggcc gtcggccat gggggccct ttaataggct cgcccaagcgc 3120
ctggcttgct gcgcgtgcgag tggctgcgggt tgcgagaagc cggccggccac ctccctgcgt 3180
ttctcggcgtg caaatcttcg tccctgtact tgatagcgat tggatattaa cccctgggc 3240
gcccgttgc tggaaaggca caggttaggaa gcccggccgtg cgggtgcac gtcggccgc 3300
ctggggaggag tctccctccc ttggctctcc ttctgggaa ctggccggcgtg tccctgtacgc 3360
ttggcggttc cagagtgcgg gctgcacgga gaccgcggca gcccggccggag agcccgcccc 3420
agccccctcc cacagcgcgg cgggtgcgtg cccggccgcata tg 3462

〈210〉 31

〈211〉 3455

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

〈220〉

<221> promoter

〈222〉

<400> 31

gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaacccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaaat tggcctagcg tggtgtcg 2040
tgtctgtggt cgccagttact caggagacca aggttaggagg taggaaacca aggttaggagg 2100
atcacccgag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc ctgtcttac 2160
taaaaataca aaatttagctg ggcgtggtgg tgcattgcctg taattccagc tacttggag 2220
gctgagacag gagaatggct tgaacccgga aggccggat tgcggtgagc tgagatcg 2280
tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa aaaaaatata 2340
tatataatgtg tgggtgtgtg tgggtgtgtg tatgtatata tatataatgtt tgggtatata 2400
tatgtatgtg tgggtgtgca tatataatata tacactttgt ttaattgtaa gttgttttag 2460
tttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg agaactgaag 2520
agtttgc(ccc) agcccatcca gcacaccatg ggcccaaggcc agacccttggg gctaggcggt 2580
cttgggttcc agagggctcc catgcccctg tcctattgct cttctggcaa taggacattt 2640
acgcgggggg ggtggttctt gattctgggt cttttagggg actctgtgat taagaaacag 2700
cagggatgtt gcaacagcag ggatgagggtg ggcctgggca cgggtcagtg aagggtcttc 2760
attcctagct gctgacctga tctgcctga gataaaagac taagacccag agagtgaacg 2820
ctgtccgcgg gggcagaagc gagtgaggcg tcgggacagt ggggcataac caagagcaaa 2880
acgcaaactg agacttcage gcccgttct cgggccagcc cacgcctctt gcctcagctc 2940
aatgccactc cctccccgcc aagtggctct ccgcctctt ggcgggaccg agttctccgg 3000
tggcccccgtt aggctccggc agcgagctct tggaggctgg gaaaaagatg aaaaaaggggg 3060
cgctgactgg gccgtccaaa gaggaggggg ctttaatag gctcggccag cgccctggctt 3120
gctgcgtgc gatggctgc ggttgcgaga agccgcccgg caccttccgc tagttctcg 3180
ctgcaaatct tcgtcccttgc acttgacagc gattgtactt aagctccag ggcgcgcctt 3240
gcttggaaag gcacaggtt gaaagcgcggg ctggccgggtg cacgcctcgcc gcccctggag 3300
gagtctccctt cccttggctc tccttcttgg gaaactgcccgg ctgtccctt gcttggcgg 3360
ttccagagtg cgggctgcac ggagaccgcg gcagcggccg gagagcccg cccagcccc 3420
tcccacagcg cggcggtgcg ctgccccggc ccatg 3455

<210> 32

<211> 11

<212> Peptide

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Arg Gly ser Val Val Leu thr Ala Lys Cys

<210> 33

<211> 13

<212> Peptide

<213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5 10

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

agagcggccg cctgctggct cagggtgtag ctggcgcc

38

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

agagcggccg cggaaccatc caccctgtgc ttgttgag

38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Flannery CR et al., "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage," Biochem Biophys Res Commun. Vol. 260 (July 1999) pp.318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al., "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. Vol. 274 (August 1999) pp.23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al., "Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins." Science. Vol. 284 (June 1999) pp.1664-6.	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 February, 2001 (06.02.01)Date of mailing of the international search report
06 March, 2001 (06.03.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Flannery CR et al. "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage." Biochem Biophys Res Commun. 第260巻 (1999 Jul) p. 318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al. "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. 第274巻 (1999 Aug) p. 23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al. "Purification and cloning of aggrecanase -1: a member of the ADAMTS family of proteins."	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.02.01

国際調査報告の発送日

06.03.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

加藤 浩

印 4B 9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/07917

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Science. 第284巻 (1999 Jun) p. 1664-6.	

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

